

**Klonierung, Expression und enzymkinetische
Charakterisierung der hämagglutininspaltenden
Protease TMPRSS2**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Pharmazie

der PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG

vorgelegt von

Daniela Meyer

aus Offenbach am Main

Marburg/Lahn 2014

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg

als Dissertation angenommen am: 14.05.2014

Erstgutachter: Prof. Dr. Torsten Steinmetzer

Zweitgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Garten

Tag der mündlichen Prüfung: 15.05.2014

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden auf Anregung von Herrn Prof. Dr. Torsten Steinmetzer am Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereichs Pharmazie der Philipps-Universität Marburg in der Zeit von Juni 2008 bis August 2012 durchgeführt.

„Wege entstehen dadurch, dass man sie geht“

Franz Kafka

Abkürzungen

Abkürzungen für Aminosäuren und deren Derivate werden den Empfehlungen der *IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature* (JCBN) und des *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (NC-IUBMB)¹ entsprechend verwendet. Sie werden im Drei- oder im Ein-Buchstaben-Code angegeben. Alle Aminosäuren und ihre Derivate liegen in L-Konfiguration vor, andernfalls wird dies ausdrücklich gekennzeichnet. Abkürzungen für chemische Verbindungen sind aus den einschlägigen Nachschlagewerken *Methods of organic chemistry* (Houben-Weyl), *March's Advanced organic chemistry* und *Greene's Protective groups in organic synthesis* übernommen.

Å	Ångström ($1\text{Å} = 10^{-10}\text{ m}$)
Abu	2-Aminobuttersäure
ACN	Acetonitril
AMBA	4-Amidinobenzylamid
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
APS	Ammoniumpersulfat
ber.	berechnet
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Bzls	Benzylsulfonyl
Cbz	Benzyloxycarbonyl
Cha	Cyclohexylalanin
Chg	Cyclohexylglycin
CMK	Chlormethylketon
DCM	Dichlormethan

¹ <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/jcfn/>

Dec	Decanoyl
dest.	destilliert
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
EtOAc	Essigsäureethylester
gef.	gefunden
ges.	gesättigte
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
h	Stunden
HA	Hämagglutinin
HAc	Essigsäure
<i>hArg</i>	<i>homo</i> -Arginin
HAT	<i>human airway trypsin-like protease</i>
Hht	Hexahydrotyrosin
<i>hPhe</i>	<i>homo</i> -Phenylalanin
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
K_i	Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
L	Liter
LB	Luria Bertani
M	molar
MCS	Multiple cloning site

MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney</i> (Zellen)
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
N	normal
n.d.	nicht bestimmt
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
Nva	Norvalin
OD	optische Dichte
OMe	Methylester
OtBu	<i>tert.</i> -Butylester
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS	Phosphate Buffer Salin
PC	Proteinkonvertase
PDB	Proteindatenbank
PFU	<i>plaque forming units</i>
pH	potentia Hydrogenii
Pip	Piperidin
pK _a	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
<i>p</i> NA	<i>para</i> -Nitroanilin
ppm	<i>parts per million</i>
PyBOP	Benzotriazol-1-yl- <i>N</i> -oxy-tris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphat
Pyr	Pyridyl
RFU	relative Fluoreszenzeinheit
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Rounds per minutes (Umdrehungen pro Minute)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfate-Polyacrylamide-Gel-Elektrophorese
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
tBu	<i>tert.</i> -Butyl

Abkürzungen

TFA	Trifluoressigsäure
TfB	Transformation Buffer
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
THF	Tetrahydrofuran
TMPRSS2	<i>transmembrane protease serine 2</i> ; Synonym: Epitheliasin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTSP II	<i>Type II transmembrane serine protease</i>
UV	Ultraviolett
V_{\max}	Maximalgeschwindigkeit der Enzymreaktion

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	i
Inhaltsverzeichnis	v
1 Influenza	1
1.1 Einleitung.....	1
1.2 Aufbau der Influenzaviren.....	3
1.3 Vermehrungszyklus der Influenzaviren.....	5
1.4 Antigen-Drift und Antigen-Shift	8
1.5 Spaltung des Hämagglutinins	8
1.6 Rezeptorspezifität	10
1.7 Prophylaxe und Therapie der Virusgrippe.....	11
2 Typ II transmembrane Serinproteasen	15
2.1 Einleitung und Klassifizierung	15
2.2 Die Hepsin/TMPRSS-Subfamilie	18
2.3 Die Matriptase-Subfamilie.....	19
2.4 HAT/DESC-Subfamilie	20
2.5 TMPRSS2.....	21
2.5.1 Einleitung	21
2.5.2 Physiologie und Pathophysiologie der TMPRSS2.....	21
2.5.3 Artifizielle Substrate der TMPRSS2.....	26
2.5.4 Inhibitoren der TMPRSS2.....	27
2.5.5 Aktivierung der Influenza A-Viren durch TMPRSS2 und HAT	27
2.6 Matriptase	30
2.6.1 Einleitung	30
2.6.2 Physiologie und Pathophysiologie der Matriptase	31

2.6.3 Inhibitoren der Matriptase	33
2.7 HAT - human airway trypsin like Serinprotease.....	34
2.7.1 Einleitung.....	34
2.7.2 Physiologie und Pathophysiologie der HAT	34
2.7.3 Inhibitoren der HAT	35
3 Ziel der Arbeit	37
4 Ergebnisse und Diskussion	39
4.1 Konstruktion der Expressionsplasmide pET24(b)-TMPRSS2 und pET24(b)-HAT und der Plasmide für Mutanten der TMPRSS2.....	39
4.2 Heterologe Produktion, Reinigung, Rückfaltung und Aktivierung	
der rekombinanten TMPRSS2.....	41
4.2.1 Expression der TMPRSS2	41
4.2.2 Renaturierung mittels <i>rapid dilution</i> Methode	43
4.2.3 Renaturierung mittels einer Ni-NTA-Säule.....	45
4.2.4 Aktivierung der TMPRSS2 mit der Dipeptidylpeptidase DAPase.....	47
4.2.5 SDS-PAGE und Western Blot.....	48
4.3 Heterologe Produktion, Reinigung, Rückfaltung und Aktivierung	
der rekombinanten Matriptase	50
4.3.1 Expression der Matriptase	50
4.3.2 Rückfaltung der Matriptase	51
4.3.3 Aktivierung der Matriptase mit DAPase	52
4.4 Heterologe Produktion, Reinigung, Rückfaltung und Aktivierung	
der rekombinanten HAT	55
4.4.1 Expression der HAT	55
4.4.2 Rückfaltung der HAT	56
4.5 Proteinkonzentrationsbestimmung.....	58
4.6 Screening der pNA-Substrate mit TMPRSS2.....	60
4.7 Screening der AMC-Substrate mit TMPRSS2.....	62

4.8	Inhibitor-Screening mit TMPRSS2	66
4.8.1	Substratanaloge Inhibitoren	68
4.8.2	Sulfonylierte Amide des 3-Amidinophenylalanins	76
4.9	Homologiemodell der TMPRSS2.....	82
4.10	Neue fluorogene Substrate der TMPRSS2	86
4.11	Synthese der Substrate	87
4.12	Untersuchungen zur Hemmung der Virusausbreitung.....	89
5	Zusammenfassung	95
5.1	Expression der Matriptase	95
5.2	Klonierung, Expression, Reinigung, Rückfaltung und Aktivierung	
	der HAT	96
5.3	Klonierung, Expression, Reinigung, Rückfaltung und Aktivierung	
	der TMPRSS2	96
5.4	Substrate der TMPRSS2	96
5.5	Inhibitoren der TMPRSS2	97
5.6	Neue fluorogene Substrate.....	99
6	Experimenteller Teil	101
6.1	Biochemische Methoden	101
6.1.1	Materialien für die biochemischen Methoden.....	101
6.1.1.1	Chemikalien.....	101
6.1.1.2	Geräte	103
6.1.1.3	Lösungen und Puffer	104
6.1.1.4	Primer, Plasmide und Bakterienstämme.....	107
6.1.2	DNA-Methoden.....	108
6.1.2.1	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	108
6.1.2.2	Reinigung der PCR-Produkte	109
6.1.2.3	Restriktion	109
6.1.2.4	Gelextraktion	110

6.1.2.5 DNA-Konzentrationsbestimmung	110
6.1.2.6 Ligation	111
6.1.2.7 Plasmid-Transformation	111
6.1.2.8 Plasmid-Minipräparation	112
6.1.2.9 Übernachtkultur	112
6.1.2.10 Agarose-Gelelektrophorese	112
6.1.2.11 Mutagenese mittels PCR	113
6.1.2.12 <i>DpnI</i> -Verdau	113
6.1.2.13 Sequenzierung	113
6.1.2.14 Glycerolstammlösungen	113
6.1.3 Protein-Methoden	114
6.1.3.1 Expression	114
6.1.3.2 Zell-Lyse	114
6.1.3.3 Denaturierung und Reinigung über einen His-Tag	115
6.1.3.4 Renaturierung des Proteins mittels <i>rapid dilution</i> Methode	116
6.1.3.5 Denaturierung, Reinigung und Renaturierung mittels einer Ni-NTA Säule	116
6.1.3.6 Aktivierung des Proteins durch Abspaltung des His-Tags	117
6.1.3.7 Präparative Größenausschlusschromatographie	117
6.1.3.8 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	118
6.1.3.9 Western Blot	119
6.2 Chemische Methoden	121
6.2.1 Materialien und Methoden	121
6.2.1.1 Verwendete Materialien	121
6.2.1.2 HPLC	121
6.2.1.3 Lyophilisierung	122
6.2.1.4 Massenspektrometrie	122
6.2.2 Enzymkinetische Messungen mit chromogenen <i>pNA</i> -Substraten	123
6.2.2.1 Allgemeines	123
6.2.2.2 Screening chromogener Substrate	123
6.2.2.3 Bestimmung der enzymkinetischen Parameter chromogener Substrate	124

6.2.3 Enzymkinetische Messungen mit AMC-Substraten	125
6.2.3.1 Allgemeines	125
6.2.3.2 Bestimmung der enzymkinetischen Parameter fluorogener Substrate	126
6.2.3.3 Screening der TMPRSS2-Hemmung	127
6.2.3.4 Bestimmung der Hemmkonstanten der TMPRSS2-Inhibitoren.....	127
6.2.4 Titration der aktiven Zentren.....	128
6.2.5 Allgemeine Synthesevorschriften	130
6.2.6 Synthese der Vorstufen	131
6.2.7 Synthese der Substrate	135
Literatur	139
Veröffentlichungen.....	151
Anhang.....	152
Danksagung	165
Erklärung	167
Lebenslauf.....	168

1 Influenza

1.1 Einleitung

Influenzaviren vom Typ A und B infizieren nach Angaben der WHO jährlich über 1 - 10 % der Weltbevölkerung, wobei etwa ein Drittel der Infektionen asymptomatisch verlaufen [1-3]. Bei diesen saisonalen Ausbrüchen vorwiegend in Wintermonaten handelt es sich meist um eine Infektion der oberen Atemwege, wobei zunächst die Epithelien des Nasenrachenraums und der Bronchialschleimhaut betroffen sind, jedoch eine Virusausbreitung bis in die oberen Bronchien erfolgen kann [4]. Zu den typischen Symptomen einer Influenza-Infektion zählen unter anderem ein plötzlich einsetzendes schweres Krankheitsgefühl mit hohem Fieber über 39 °C, Kopf- und Muskelschmerzen, Schnupfen und unproduktiver Husten, die meist 1-5 Tage nach Infektion einsetzen [4]. Während das Krankheitsbild beim gesunden Erwachsenen üblicherweise milde Verlaufsformen aufweist, die in der Regel nach 1-2 Wochen beendet sind, können Influenza-Infektionen bei älteren Menschen, Kindern oder Menschen mit Vorerkrankungen schwerwiegende Komplikationen hervorrufen, die aber auch bei Erwachsenen ohne Vorerkrankungen auftreten können. Laut Angaben des Robert-Koch-Instituts führen solche Komplikationen jährlich zu mehr als 10 000 Krankenhausaufenthalten in Deutschland [5]. In der Saison 2012/2013 infizierten sich in Deutschland etwa 66 000 Patienten nachweislich mit Influenzaviren, von denen 10 660 hospitalisiert werden mussten. Die Mortalität in dieser Saison lag bei 195 nachgewiesenen Fällen (Stand Mai 2013) [5], schwankt allerdings je nach Pandemie.

Im Gegensatz zu diesen epidemischen Ausbrüchen stehen die sogenannten pandemischen Ereignisse, die durch Viren hervorgerufen werden, die bis dahin noch nicht im Menschen aufgetreten sind. Diese Viren weisen meist ein vollständiges oder partielles Genom von aviären Viren auf und können noch nicht vom humanen Immunsystem erkannt werden [6].

In den letzten 150 Jahren wurden fünf größere Pandemien verzeichnet, wobei die „Spanische Grippe“ von 1918 mit über 50 Millionen Toten weltweit als die äußerste

fatales Ereignis der Geschichte bezeichnet werden kann [7]. Diese Pandemie wurde durch ein Virus des Subtyps H1N1 verursacht, das zunächst vom Mensch auf das Schwein übertragen wurde, sich dort in 2 Linien aufspaltete und erneut den Menschen infizierte, wobei beide Viruslinien heute noch persistieren. Auffälliger- und ungewöhnlicher Weise wurden bei der „Spanischen Grippe“ vorwiegend gesunde junge Erwachsene infiziert, bei denen auch die höchste Mortalitätsrate zu verzeichnen war [7, 8].

Die jüngste Influenza Pandemie ereignete sich im Jahr 2009 und wurde ebenfalls durch ein Virus des Subtyps H1N1 hervorgerufen, das durch eine Reassortierung mit zwei anderen Virustypen des Schweins entstand und eine Verwandte des pandemischen Virus von 1918 darstellt [7]. An dem zuerst in Mexiko isolierten Stamm erkrankten etwa 41 Millionen Menschen weltweit, von denen etwa 17 000 verstarben [9].

Der hochpathogene, aviäre H5N1 Subtyp kann als Zoonose auch Menschen infizieren und stellt momentan ein gefährliches Influenzavirus dar, das die Spezies-Grenze überschritten hat. Die Mortalität liegt bei über 50 %, jedoch sind weltweit nur ca. 1000 Menschen betroffen (www.WHO.int). Im Moment wird dieser Subtyp nicht von Mensch zu Mensch übertragen. Niemand kann vorhersagen, ob oder wann Mutationen zu einem pandemischen Virus stattfinden, sodass eine Übertragung von Mensch zu Menschen möglich ist [10]. Diese Viren infizieren vorwiegend Zellen des unteren Respirationstraktes, können sich jedoch auch selten in anderen Geweben wie Darm und ZNS ausbreiten [11]. Nach Angaben der WHO wurden bis heute weltweit 380 Todesfälle bestätigt, die auf eine Infektion mit Viren vom Subtyp H5N1 zurückzuführen sind [12].

1.2 Aufbau der Influenzaviren

Influenzaviren gehören zur Familie der *Orthomyxoviridae* und werden auf Grund ihrer Antigenität der konservierten inneren Virusstrukturen, wie dem Nucleoprotein, dem Matrixprotein M1 und dem Membranprotein M2 der Virushülle, in drei serologisch verschiedene Typen A, B und C eingeteilt [11]. Influenzaviren der Typen B und C infizieren vorwiegend Menschen, konnten jedoch auch sporadisch in anderen Säugetieren nachgewiesen werden. So wurden Influenza B Viren aus Robben und Influenza C Viren aus Schweinen isoliert, wobei die natürlichen Reservoirs dieser Typen bis heute unbekannt sind [13]. Influenzaviren vom Typ A werden weiterhin auf Grund der serologischen Aktivität ihrer Oberflächenproteine Hämagglutinin und Neuraminidase in weitere Subtypen gegliedert [14]. Zurzeit sind 16 verschiedene Hämagglutinine und 9 Neuraminidasen bekannt, wobei von den 144 möglichen Kombinationen bis heute 105 aus Wasservögeln isoliert werden konnten, die somit das natürliche Reservoir von Influenza A Viren darstellen [6]. Eine Infektion von Wasservögeln mit diesen Viren verläuft normalerweise asymptomatisch, wenn diese den Intestinaltrakt befallen. Eine Infektion bei domestizierten Tieren kann nach direktem Kontakt mit Wasservögeln oder mit Wasserstellen, die durch Fäkalien kontaminiert sind, ausgelöst werden [11]. Im Menschen verursachten bisher drei Subtypen (H1N1, H3N2, H3N2) Pandemien mit hohen Morbiditäts- und Mortalitätsraten. Momentan zirkulieren epidemische H1N1 und H3N2 Subtypen in der menschlichen Population, die zwar niedrig pathogene Varianten darstellen, jedoch eine signifikante Mortalitätsrate bei älteren Menschen aufweisen [6,14].

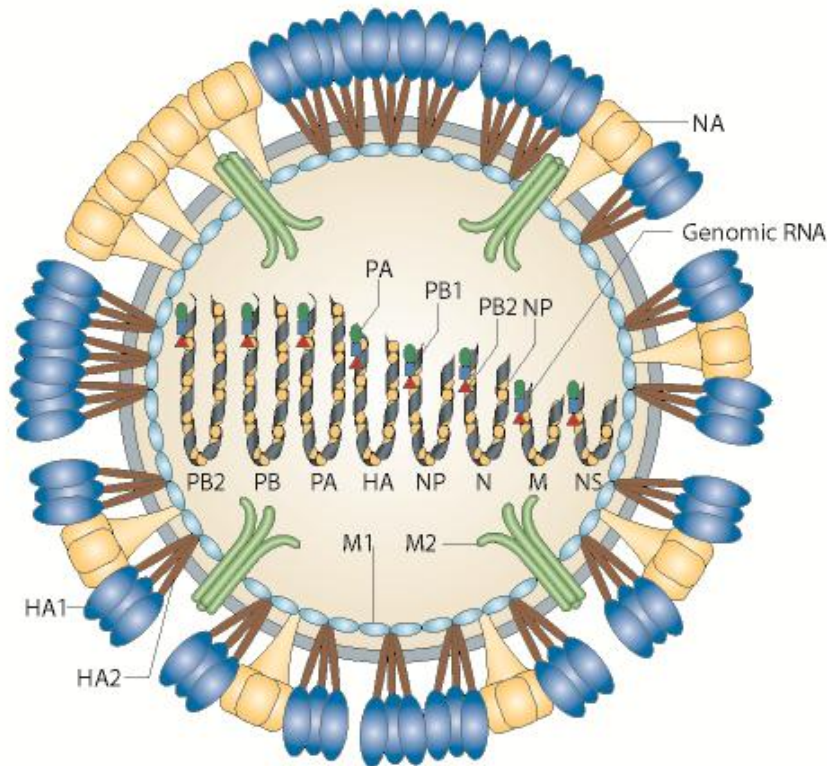


Abbildung 1.1. Schematische Darstellung des Influenza A Virus. Das Hämagglutinin (HA), die Neuraminidase (NA) und das Membranprotein 2 (M2) sind auf und in der Virushülle exponiert. Das Matrixprotein M1 kleidet die Innenseite der Membran aus, die von der Wirtszelle stammt. Das virale Genom ist aus acht Minusstrang-RNA-Segmenten aufgebaut und liegt als Komplex mit dem Nucleocapsid-Protein (NP) und dem Polymerasekomplex PA, PB1 und PB2 vor (Abbildung aus Hedestam, 2008 [15]).

Influenzaviren weisen meist eine sphärische Struktur mit einem Durchmesser von ca. 100 nm auf [16]. In ihre Hülle, eine Lipidmembran der ursprünglichen Wirtszelle, sind die Membranproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) sowie der Ionenkanal M2 inkorporiert. Die Innenseite der Virushülle ist mit dem Matrixprotein 1 (M1) ausgekleidet. Im Lumen der Influenza A und B Viren befinden sich acht Minusstrang-RNA-Segmente, die für 12 Proteine codieren. Das Genom der Influenza C Viren besteht jedoch nur aus sieben Minusstrang-RNA-Segmenten [17]. Influenza C Viren spielen für eine Grippeinfektion allerdings kaum eine Rolle. Deshalb soll im weiteren Verlauf dieser Arbeit auf diese nicht weiter eingegangen werden.

Die RNA-abhängige RNA-Polymerase ist ein Komplex aus drei Proteinen, dem *Polymerase Basic Protein 1* (PB1), dem *Polymerase Basic Protein 2* (PB2) und dem

Polymerase Acidic Protein (PA), wobei die eigentliche Polymerase-Aktivität auf dem PB1 lokalisiert ist. Ein weiteres Protein PB1-F2 wird ebenfalls vom PB1-RNA-Segment mit einem alternativen *Open Reading Frame* (offener Leserahmen) codiert, jedoch ist dessen Funktion bis heute noch unbekannt. Die RNA-Einzelstrangsegmente liegen im Virusinneren als Ribonukleoprotein (RNP)-Komplexe mit dem NP-Protein und am 3'-Ende mit dem Polymerasekomplex PB1-PB2-PA vor [18-20].

1.3 Vermehrungszyklus der Influenzaviren

Wie alle Viren können sich Influenzaviren nur in geeigneten Wirtszellen vermehren [21]. Zu Beginn einer Infektion binden die Influenzaviren über ihr als Trimer vorliegendes Oberflächenprotein Hämagglutinin (HA) an endständige N-Acetylneuraminsäuren (Sialinsäuren) von Glykoproteinrezeptoren der Wirtszelloberfläche [22], wobei die nur moderate Bindungsaffinität ($K_{\text{diss}} > 0,1 \text{ mM}$) [23] von HA an Sialinsäuren über die gleichzeitige Bindung mehrerer HA-Trimere kompensiert wird. Anschließend kommt es zur Virusaufnahme in die Wirtszelle mittels Endozytose. Im Lumen der Endosomen liegt ein saures Milieu vor, wobei der pH-Wert bei der Reifung der Endosomen durch spezielle Protonenpumpen (V-ATPasen) in der Endosomenmembranen noch weiter erniedrigt wird [24]. Dadurch erfolgt ein irreversibler Konformationswechsel der HA-Homotrimere, wodurch N-terminal helikale HA2-Domänen exponiert werden, die an die Endosomenmembran binden [25]. Durch diesen drastischen Konformationswechsel der HA2-Untereinheit zu einer haarnadelartigen Struktur wird die Verschmelzung der Virushülle mit der Endosomenmembran möglich [25]. Jedoch ist für diesen Prozess die vorherige Spaltung des Vorläuferproteins HA0 in seine Untereinheiten HA1 und HA2 essentiell (siehe Abschnitt 1.5). Da das Genom der Influenzaviren für keine solche Protease codiert, müssen die Viren für eine erfolgreiche Infektion auf Proteasen des Wirts zurückgreifen [26].

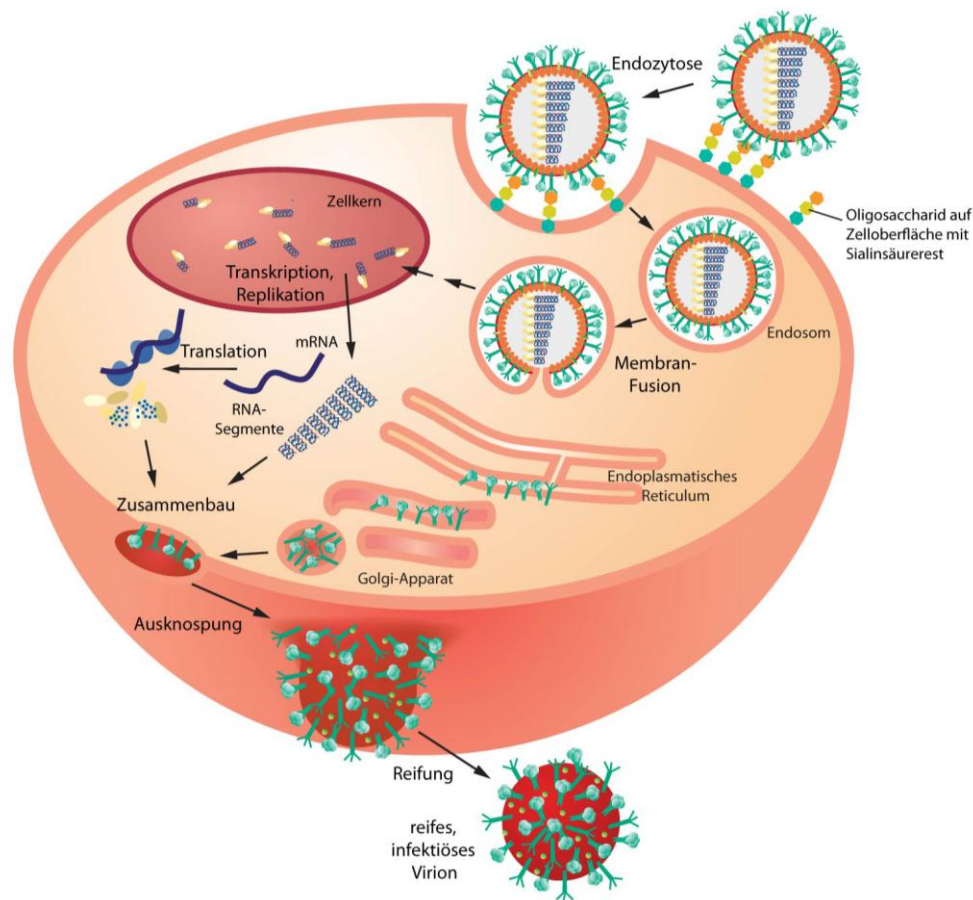


Abbildung 1.2. Vermehrungszyklus der Influenzaviren. Nach der Bindung der Viren an endständige Sialinsäuren an Rezeptoren auf der Wirtszelloberfläche durch das HA erfolgt die Virusaufnahme über Endozytose. Durch das saure Milieu innerhalb der Endosomen wird ein Konformationswechsel des HA induziert und es kommt zu einer Verschmelzung der Virusmembran mit der Endosomenmembran. Durch einen weiteren Protoneneinstrom durch die M2-Kanäle werden die Interaktionen der RNP-Komplexe mit dem M1-Protein geschwächt. Dadurch gelangt das Nucleocapsid durch die Fusionspore ins Zytosol (*uncoating*) und wird aktiv in den Zellkern transportiert, wo die Replikation und Transkription stattfindet. Die Virusproteine werden am endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und zur apikalen Zellmembran transportiert, wo sich ein neues Virus abschnürt (*budding*). Dabei ist das neue Virus noch durch HA an Sialinsäurereste der Wirtszelle gebunden, wird aber anschließend durch die NA abgespalten und freigesetzt (Abbildung aus Steinmetzer [24]).

Beim sogenannten *uncoating* strömen Protonen aus dem Endosomenlumen durch die M2-Kanäle, die in die Virusmembran eingelagert sind, ins Virusinnere. M2-Kanäle sind ein Homotetramer, die die virale Membran durchspannen und durchlässig für Protonen sind. Dieser pH-abhängige Ionenkanal wird durch vier Histidine gesteuert, die im neutralen bis basischen Milieu deprotoniert vorliegen und durch Wasserstoffbrückenbindungen die Pore verschließen. In saurer Umgebung werden diese Histidine jedoch protoniert, verändern ihre räumliche Orientierung und bilden keine Wasserstoffbrücken mehr aus, wodurch die Pore durchlässig für Protonen wird [27].

Durch den erniedrigten pH-Wert im Viruslumen wird die Bindung der RNP-Komplexe an das M1-Protein geschwächt. Dadurch wird das Nucleocapsid freigesetzt, gelangt durch die Fusionspore ins Zytoplasma und anschließend aktiv in den Zellkern transportiert [28, 29].

Im Zellkern selbst unterscheidet man zwei Vorgänge: bei der Transkription wird die (-)-RNA in mRNA umgeschrieben, die als Matrize für die Proteinbiosynthese dient. Für diesen Primer-abhängigen Prozess werden 5'-Cap-Gruppen aus 10-15 Nucleotiden von Wirts-mRNA mit Hilfe der Endonucleaseaktivität der RNA-Polymerase abgespalten (*cap snatching*), die dann mit dem PB2-Segment des RNP-Komplexes interagieren und an das 3'-Ende der viralen RNA angelagert werden [23, 30]. Durch dieses *cap snatching* werden zelluläre Transkriptions- und Translationsprozesse gehemmt, sodass die Funktion einer infizierten Zelle fast nur noch auf die Virusvermehrung ausgerichtet ist [16]. Bei der Replikation, einem Primer unabhängigen Vorgang, wird zunächst eine (+)-RNA geschrieben, die als Matrize für die virale (-)-RNA verwendet wird. Beide Prozesse werden durch die viruseigene RNA-Polymerase katalysiert, wobei der Wechsel von Transkription zu Replikation durch die Bindung von NP (Nucleoprotein) an den RNA-Polymerase-Komplex initiiert wird [23]. Die neu synthetisierte RNA lagert sich noch im Zellkern mit dem Polymerase-Komplex zusammen, dieser interagiert anschließend mit dem M1-Protein und wird, möglicherweise durch NEP/N2 vermittelt, aus dem Zellkern ins Zytosol exportiert [18, 19]. Die Proteine der Virushülle werden im Zytosol am endoplasmatischen Retikulum synthetisiert, gefaltet und nach N-Glykosylierung im Golgi-Apparat zur apikalen Zellmembran transportiert [16]. Die Polymerasae, das NP und nichtstrukturelle Proteine werden wieder in den Kern transportiert und sind am Aufbau neu gebildeter Nucleocapside beteiligt [29].

Der letzte Schritt der Virusvermehrung ist die Knospung (*budding*). Hierbei stülpt sich, vermittelt durch die Anlagerung von M1, die Zellmembran aus, alle strukturellen Virusbestandteile werden inkorporiert und ein neues Viruspartikel schnürt sich ab. Dieses neu entstandene Virus ist zu diesem Zeitpunkt noch über HA-Trimere an endständige Sialinsäuren der Zelloberflächenglykoproteine mit der Wirtszelle verknüpft. Durch die Abspaltung der Sialinsäure durch die Neuraminidase, während des Transports zur Plasmamembran, kann das Virus freigesetzt werden [22].

1.4 Antigen-Drift und Antigen-Shift

Das Genom von Influenzaviren weist durch die relativ niedrige Genauigkeit der RNA-abhängigen RNA-Polymerase und deren fehlende „*proofreading Funktion*“ wegen des RNA-Einzelstrangs eine hohe Mutationsrate auf [17]. So erfolgen durchschnittlich 1×10^{-3} bis 8×10^{-3} Punktmutationen pro Aminosäure pro Jahr im Genom der Influenzaviren [14]. Durch den Selektionsdruck wird gewährleistet, dass neue Varianten mit Wachstumsvorteilen überleben und sich ausbreiten. Diese schrittweisen Mutationen im HA und NA werden als Antigen-Drift bezeichnet und führen dazu, dass Antikörper des Wirts die veränderten Antigen-Strukturen nicht mehr erkennen können [7].

Wenn zwei unterschiedliche Viren, von möglicherweise zwei verschiedenen Wirtsspezies gleichzeitig einen Wirt coinfizieren, kann das neuentstehende Virus beim Zusammenbau Teile von beiden Originalen austauschen [17]. Durch dieses als Antigen-Shift bezeichnete Ereignis können neue Viren mit einer sehr schwer einzuschätzenden Pathogenität mit pandemischem Potential entstehen, da die Oberflächenantigene vom Immunsystem des Menschen nicht mehr erkannt werden [31].

1.5 Spaltung des Hämagglutinins

Wie bereits erwähnt, stellt die Spaltung des Vorläuferproteins HA0 in seine Untereinheiten HA1 und HA2 einen essentiellen Schritt bei der Infektion von Wirtszellen durch Influenzaviren dar. Bereits 1975 wurde gezeigt, dass sich einige Influenzaviren in Zellkulturen nur dann effektiv vermehren, wenn sie zuvor mit Trypsin behandelt wurden, wodurch es zu einer Spaltung des HA0 kommt [32]. Die Spaltsequenz stellt einen wichtigen Pathogenitätsfaktor für eine Influenzainfektion dar. Sogenannte LPAI-Viren (*low pathogenic avian influenza*) besitzen eine monobasische Spaltstelle, wobei das HA0 meist hinter einem einzelnen Arginin, selten nach Lysin gespalten wird. Niedrigpathogene Viren infizieren bei Vögeln den Intestinaltrakt und verursachen Infektionen ohne Erkrankung oder solche mit milden Verlaufsformen. Beim Menschen ist solch eine Infektion meist auf den Respirationstrakt beschränkt. Bis heute konnten einige trypsinartige Serinproteasen, wie TMPRSS2, HAT (*human airway*

trypsin-like Protease) und TMPRSS4, im humanen Respirationstrakt identifiziert werden, die das Hämagglutinin von LPAI-Viren und der meisten Influenzaviren, die bei Säugern und Menschen auftreten, spalten [33-35]. Typische Spaltsequenzen der Subtypen H1, H2 und H3 und der hochpathogenen Subtypen H5 und H7, sowie deren aktivierenden Proteasen sind in Tabelle 1.1 dargestellt.

Tabelle 1.1. Charakteristische Spaltsequenzen des Hämagglutinins einiger Virus-Subtypen, die durch verschiedene Proteasen gespalten werden. Die Aminosäuren C-Terminal der Spaltstelle sind hochkonserviert. Tabelle modifiziert nach Steinmetzer [24].

Subtyp	Trypsinartige Serinproteasen (TMPRSS2/HAT/TMPRSS4)	Subtyp	Proteinkonvertase (z.B. Furin / PC5/6)
H1	...IQS R ↓GLFG...	H5	... RKKR ↓GLFG...
H2	...IES R ↓GLFG...	H7	... RKKR ↓GLFG...
H3	...KQT R ↓GIFG...		

Eine Besonderheit innerhalb der Gruppe der niedrigpathogenen Viren stellen die Viren des Subtyps H9N2 dar. Verschiedene Isolate dieses Virus weisen nicht nur eine monobasische Spaltstelle auf, es konnten auch Isolate bestimmt werden, die eine di- oder tribasische Spaltstelle besitzen (Tabelle 1.2). Diese multibasischen Subtypen können allerdings nicht durch Furin aktiviert werden. Im Gegensatz zu den Spaltstellen der HPAI-Viren (*high pathogenic avian influenza*) der Subtypen H5 und H7 entwickelten sich die di- oder tribasischen Spaltstellen des Subtyps H9N2 durch einen Austausch und nicht durch eine Insertion von basischen Aminosäuren. Die Arbeitsgruppen Garten/Böttcher-Friebertshäuser und Klenk (Baron et al. [36]) konnten zeigen, dass alle drei Virus-Varianten durch die bereits bekannten Proteasen TMPRSS2 und HAT aktiviert werden können. Einige Subtypen mit di- oder tribasischer Spaltstelle können jedoch *in vitro* zusätzlich durch Matriptase aktiviert werden, die im Gegensatz zu vielen TTSPs in einem weiten Spektrum von Gewebsarten exprimiert wird. Dies könnte dazu führen, dass sich eine Infektion mit diesen Subtypen nicht nur auf den Respirationstrakt beschränkt, sondern auf den gesamten Organismus ausbreiten könnte [36].

Tabelle 1.2. Charakteristische Spaltsequenzen des Hämagglutinins verschiedener H9N2 Virusisolate, die durch trypsinartige Serinproteasen gespalten werden. Tabelle modifiziert nach Baron [36].

Subtyp	Sequenz	Trypsinartige Serinprotease
H9-Wisc	...VSSR↓GLFG...	TMPRSS2, HAT
H9-782	...RSSR↓GLFG...	Matriptase , TMPRSS2, HAT
H9-2061	...RSRR↓GIFG...	Matriptase , TMPRSS2, HAT

Im Gegensatz dazu stehen jedoch hochpathogene HPAI-Viren, die eine polybasische Spaltstelle im Hämagglutinin mit der Sequenz –Arg-Xxx-Lys/Arg-Arg↓-Xxx aufweisen, wobei Xxx eine beliebige Aminosäure sein kann. Diese Viren verursachen schwere und systemische Krankheiten, wobei > 75% aller infizierten Vögel sterben. Das HA0 wird bei Vögeln und Säugetieren durch ubiquitär exprimierte, Calcium-abhängige Proteinkonvertasen wie Furin, PC5/6 oder in seltenen Fällen auch bei der Spaltstelle KKRR↓ durch die trypsinartige Serinprotease TMPRSS13 aktiviert [37, 38]. Dies ist eine wichtige Voraussetzung, dass bei Infektionen mit HPAI-Viren die Virusreplikation nicht nur auf einige wenige Gewebe beschränkt ist. HPAI-Viren entstehen wahrscheinlich aus LPAI-Viren der Subtypen H5 und H7 in domestiziertem Geflügel durch Mutationen und Insertion von basischen Aminosäuren in die Spaltstelle des Hämagglutinins [26]. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit soll jedoch auf diese hochpathogenen Viren nicht näher eingegangen werden.

1.6 Rezeptorspezifität

5-N-Acetylneuraminsäuren, auch Sialinsäuren genannt, stellen den Prototyp von negativ geladenen Zuckern dar, die neun Kohlenstoffatome enthalten. Die endständigen Sialinsäuren bilden den Abschluss von Oligosaccharidketten der Glycoproteine und Glycolipide auf der Zelloberfläche des Wirts. Influenzaviren erkennen ausschließlich endständige α 2,3- oder α 2,6-gebundene Sialinsäure-Epitope [23]. Obwohl alle Influenzaviren aus Vögeln isoliert werden konnten, infizieren nur einige wenige Subtypen den Menschen [17]. Dies ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass im Gastrointestinaltrakt von Vögeln nur α 2,3-gebundene Sialinsäuren vorkommen und im

Gegensatz dazu im humanen Respirationstrakt α 2,6-verknüpfte Zuckerketten dominieren [23]. Bevor ein Influenzavirus humane Wirtszellen infizieren und damit die Spezies-Barriere überspringen kann, muss es sich an den neuen Bindungstyp anpassen. Dies geschieht meistens in so genannten *mixed vessels*, zum Beispiel im Schwein, da in dieser Spezies sowohl α 2,3- als auch α 2,6- gebundene Sialinsäuren vorkommen und sich das Virus durch Mutationen in einigen Replikationszyklen spontan anpassen kann [14].

1.7 Prophylaxe und Therapie der Virusgrippe

Den effektivsten Schutz gegen eine Influenzainfektion bietet bis heute die Immunisierung. Die Herstellung der verwendeten Impfantigene erfolgt über die Extraktion der viralen Oberflächenglykoproteine HA und NA aus der Virushülle. Die saisonalen Influenza-Impfstoffe bestehen anders als pandemische Influenza-Impfstoffe aus drei Komponenten gegen zwei Virus A- und einen B-Subtyp. Da sich die Oberflächenproteine der Viren jedoch recht schnell verändern und mutieren, besteht die Notwendigkeit im jährlichen Rhythmus den Impfstoff für die neue Saison anzupassen. So gibt die WHO für die nördliche Hemisphäre im Frühling jeder Saison ihre Empfehlung der Impfstoffzusammensetzung für die Subtypen, die mit der höchsten Wahrscheinlichkeit im nächsten Winter in der Bevölkerung zirkulieren. Jedoch ist dieser saisonale Impfstoff bei eventuell auftretenden Pandemien weitestgehend unwirksam. Um die jährliche Impfstoffversorgung zu gewährleisten gibt es besondere, „vereinfachte“ Regularien für die „beschleunigte“ Zulassung der neuen Impfstoffzusammensetzungen. Dennoch vergeht etwa ein halbes Jahr von der Empfehlung der WHO bis zur Bereitstellung des fertigen Impfstoffs [39].

Anhand des Vermehrungszyklus der Influenzaviren ergeben sich zahlreiche Angriffspunkte für potentielle antivirale Therapien, die auch Gegenstand zahlreicher Untersuchungen sind. Für einen Überblick sei auf den Übersichtsartikel von Gong verwiesen [28]. Allerdings sind zur Behandlung einer Influenzainfektion momentan lediglich zwei verschiedene Klassen von Wirkstoffen zugelassen [24], die M2-Ionenkanal- und Neuraminidase-Inhibitoren.

M2-Ionenkanal-Inhibitoren Amantadin und Rimantadin: Durch diese werden die M2-Ionenkanäle blockiert und deren geschlossene Konformation stabilisiert. Dadurch können keine Protonen mehr in das Viruspartikel einströmen und die Freisetzung der RNP-Komplexe wird blockiert. M2-Blocker sind in niedrigen Dosen wirksam gegen einige Subtypen des Typs A, jedoch unwirksam gegen Viren des Typs B. Sie müssen bereits kurze Zeit nach einer Infektion eingenommen werden, um die Virusvermehrung zu unterdrücken. Allerdings entwickeln sich rasch Resistenzen gegen diese Wirkstoffklasse, sodass diese in der Saison 2005/2006 bereits gegen 90 % der zirkulierenden H3N2-Viren unwirksam waren [27].

Neuraminidase-Inhibitoren (Abbildung 1.3): Oseltamivir; Zanamivir und Peramivir. NA-Inhibitoren blockieren die Freisetzung neuer Viren von infizierten Wirtszellen und verhindern damit die Ausbreitung der Infektion im Respirationstrakt [27]. Zusätzlich wird die Spaltung des Mucins der Schleimschicht in den Bronchien durch die Neuraminidase verhindert. Dadurch wird das Eindringen der Viren in die Epithelzellen des oberen Respirationstraks erschwert [27].

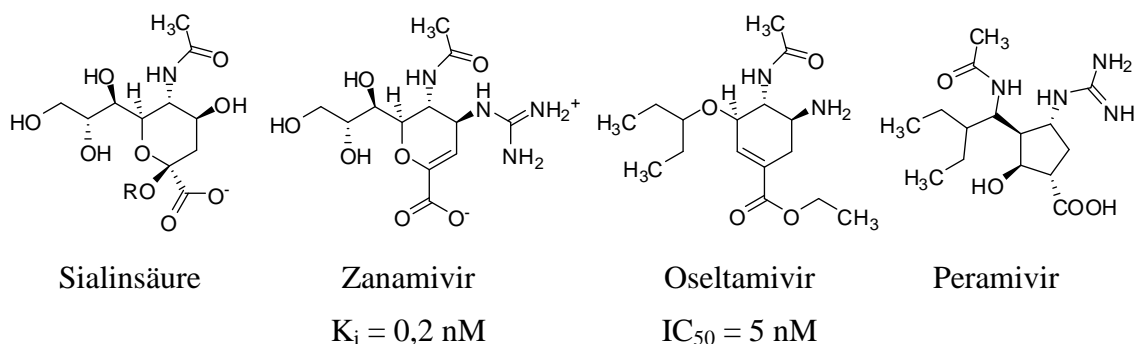


Abbildung 1.3. Struktur der Sialinsäure und der davon abgeleiteten Neuraminidasehemmstoffe Zanamivir, Oseltamivir und Peramivir [27].

Das 1999 von der Firma GlaxoSmithKline in den Markt eingeführte Zanamivir (Relenza[®]) besitzt durch seine hohe Polarität eine zu geringe orale Bioverfügbarkeit und muss daher inhalativ angewendet werden. Durch die Verwendung einer Prodrug-Strategie gelang es den Firmen Roche und Gilhead den oral bioverfügbaren Wirkstoff Oseltamivir (Tamiflu[®]) zu entwickeln. Mittlerweile werden aber auch hier Resistenzen beobachtet, deren Rate allerdings von Saison zu Saison stark variiert [27, 28].

Peramivir, der dritte Wirkstoff dieser Klasse, besitzt eine unzureichende orale Bioverfügbarkeit und wird ausschließlich in schweren Fällen parenteral appliziert.

Die begrenzte Zahl von verfügbaren Wirkstoffen zur Behandlung einer Influenza-erkrankung macht deutlich, dass die Entwicklung neuer Virusstatika mit möglichst breitem Wirkspektrum gegen die unterschiedlichen Stämme dringend erforderlich ist [24]. Die Entwicklung neuer Wirkstoffe ist auch Voraussetzung, um eine wirksame Kombinationstherapie zu entwickeln, wie sie bereits für die Behandlung gegen HIV-Infektionen etabliert ist.

2 Typ II transmembrane Serinproteasen

2.1 Einleitung und Klassifizierung

Die Familie der Typ II transmembranen Serinproteasen (TTSP) wurde erst zum Jahrtausendwechsel durch Genanalyse und Datenbankrecherchen identifiziert [40]. Anschließend wurden die gefundenen Vertreter in vier verschiedenen Unterfamilien eingruppiert. Die Gene der TTSPs konnten in allen Wirbeltieren gefunden werden. TTSPs besitzen eine kurze intrazelluläre N-terminale Domäne, eine transmembranäres Segment und eine lange extrazelluläre Domäne. Diese extrazelluläre Domäne besteht aus einer variablen *stem*-Region und einer C-terminalen Serinproteasedomäne der Chymotrypsin S1 Familie [41, 42]. Ein Aspartat am Boden der S1-Tasche lässt vermuten, dass alle TTSPs eine für trypsinartige Serinproteasen typische Präferenz für Substrate mit einer Arginin- oder Lysin-Seitenkette in P1-Position aufweisen.

Die *stem*-Region der TTSPs ist aus bis zu elf strukturell verschiedenen Domänen zusammengesetzt (Abbildung 2.1), die möglicherweise als regulatorische Segmente oder Bindedomänen fungieren, wobei deren Funktion bis heute nicht geklärt werden konnte [43]. TTSPs werden als inaktive einzelsträngige Zymogene synthetisiert, die durch eine Spaltung nach einer basischen Aminosäure in einem konservierten Motiv vor der katalytischen Domäne aktiviert werden [40]. Aufgrund einer Disulfidbrücke zwischen der Prodomäne und der katalytischen Domäne, bleiben die Proteasen jedoch nach ihrer Aktivierung membranassoziiert [43]. Einige TTSPs werden wahrscheinlich autokatalytisch aktiviert, was für Matriptase [44], Matriptase-2 [45], Hepsin [46], TMPRSS2 [47], TMPRSS3 [48], TMPRSS4 [49] und TMPRSS11C [50] *in vitro* gezeigt werden konnte. Diese Tatsache lässt vermuten, dass einige transmembrane Serinproteasen Initiatoren proteolytischer Kaskaden sind [40]. Neben dieser Spaltung kommt es bei einigen TTSPs zu einer proteolytischen Prozessierung innerhalb ihrer *stem*-Region. Diese erfolgt innerhalb konservierter Motive in der N-terminalen *SEA*-Domäne und ist für die Erlangung der proteolytischen Aktivität essentiell. Diese Spaltung löst die kovalente Verbindung zwischen der *stem*-Region mit der katalytischen Domäne, wodurch die Proteasen von der Zelloberfläche abgegeben werden können [42].

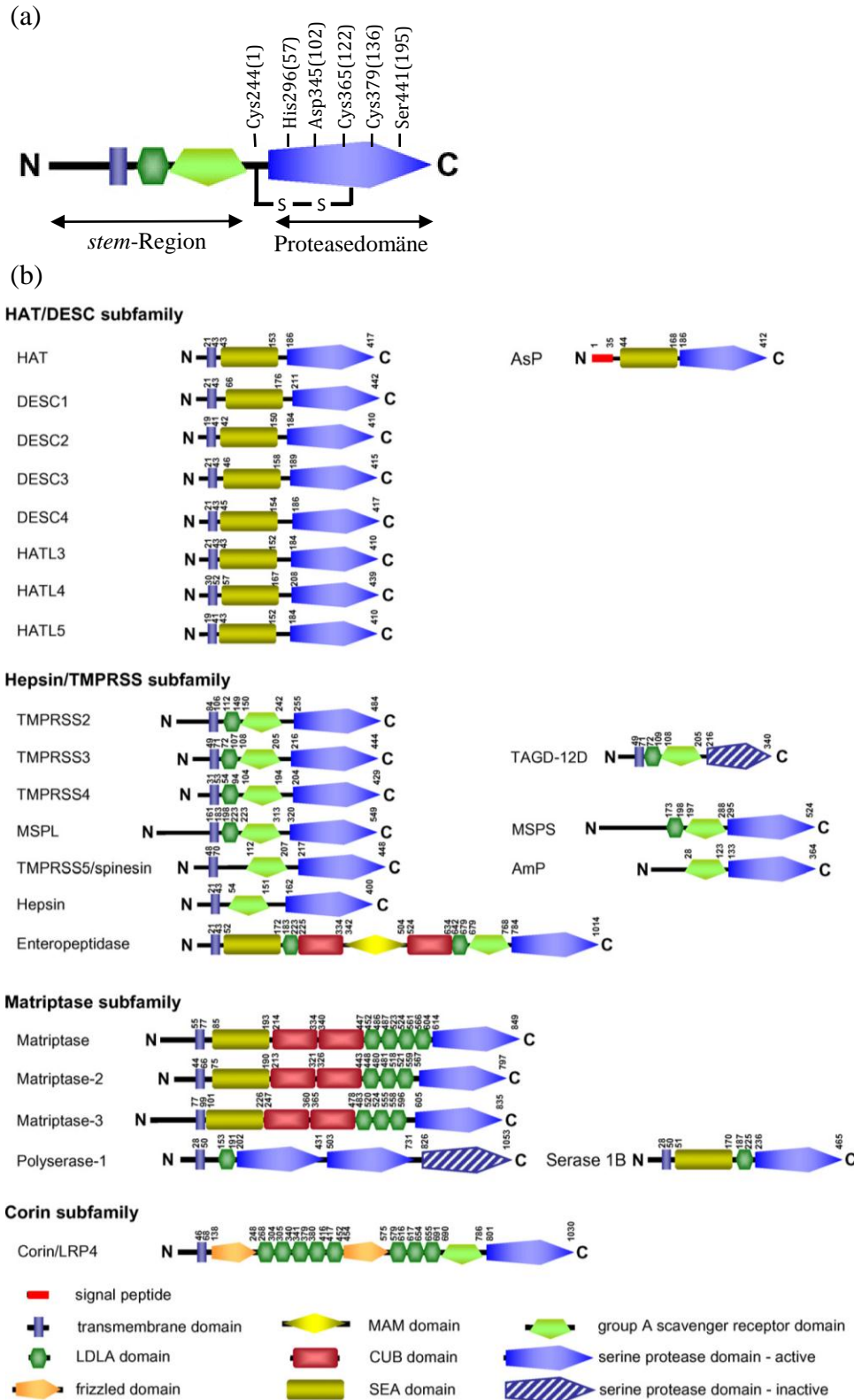


Abbildung 2.1. (a) Domänenstruktur der TMPRSS2. Die Nummerierung wichtiger Aminosäuren bezieht sich auf die membrangebundene Vollängenenzyme, die Chymotrypsinnummerierung ist in Klammern angegeben. (b) Domänenstruktur der humanen Typ II transmembranen Serinproteasen. Die Nummerierung verweist auf die Position jeder Domäne in der Aminosäuresequenz der nativen Proenzyme (Abbildung aus Szabo und Bugge, 2008 [42]).

Die katalytischen Domänen der TTSPs besitzen eine große Ähnlichkeit in ihren Aminosäuresequenzen. Neben der hochkonservierten Disulfidbrücke zwischen der Pro- und der katalytischen Domäne existieren noch sechs weitere hochkonservierte Cysteine, die drei Disulfidbrücken innerhalb der Proteasedomäne ausbilden [41], die auch bei allen anderen trypsinartigen Serinproteasen vorhanden sind [42].

Zurzeit sind 19 humane TTSPs bekannt, die auf Grund einer phylogenetischen Analyse ihrer Serinproteasedomänen und dem Aufbau ihrer *stem*-Region in vier Subfamilien eingeteilt werden [51]: die HAT/DESC-, die Matriptase- und die Hepsin/TMPRSS-Subfamilie sowie Corin.

Corin unterscheidet sich nicht nur im Aufbau seiner *stem*-Region von den übrigen TTSPs, sondern auch in der Primärstruktur der katalytischen Domäne, die näher mit einigen sezernierten und nicht-membrangebundenen Serinproteasen verwandt ist. Dies lässt vermuten, dass sich die Familie der TTSPs aus mindesten zwei „Urgenen“ evolutionär entwickelt hat [42]. Humane Corin-cDNA wurde zuerst aus dem Herz cloniert und codiert für ein Polypeptid aus 1042 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von etwa 116 kDa. Es ist durch eine komplexe *stem*-Region charakterisiert, die aus zwei *frizzled*-, acht LDLA- und einer Group A SR-Domäne aufgebaut ist. Corin wird vorwiegend in fetalen und erwachsenen Cardiomyocyten exprimiert. Diese Protease ist die physiologische Convertase der Proform des atrialen natriuretischen Peptids (pro-ANP), einem kardialen Hormon, das den Blutdruck und kardiale Funktionen durch vermehrte Natrium-Ausscheidung, Diurese und Vasodilatation reguliert. Im Maus-Modell wurde gezeigt, dass ein Defizit an aktivem ANP zu Bluthochdruck und daraus resultierenden Folgeerkrankungen führt [42].

Obwohl die physiologische Bedeutung vieler TTSPs bis heute noch nicht geklärt ist, weisen sie ein relativ begrenztes Expressionsmuster auf. Das lässt vermuten, dass sie gewebespezifische Funktionen besitzen [43]. Viele sind ideal auf der Zelloberfläche positioniert, um mit anderen Proteinen sowohl mit löslichen als auch mit Matrixkomponenten, zu interagieren [43]. Dagegen ist Matriptase die einzige Protease aus dieser Familie, die beinahe ubiquitär im menschlichen Körper exprimiert wird [52].

2.2 Die Hepsin/TMPRSS-Subfamilie

TMPRSS2 wird mit fünf weiteren Proteasen der Hepsin/TMPRSS-Subfamilie zugeordnet. Deren *stem*-Region ist aus einer *low density lipoprotein receptor A* (LDLA) Domäne, die eine Bindungsstelle für LDL und Calcium besitzt, einer *scavenger-receptor cystein-rich* (SRCR) Domäne der Gruppe A und einer Serinproteasedomäne mit trypsinartiger Substratspezifität aufgebaut [53].

Hepsin war die erste Protease, die als Typ II transmembrane Serinprotease mit einer Multidomänenstruktur erkannt wurde. Es wird vorwiegend in Hepatocyten exprimiert, konnte aber auch in einigen anderen Geweben wie Lunge, Schilddrüse, Pankreas, Hypophyse, Prostata und Nieren identifiziert werden. Obwohl mittlerweile *in vitro* viele Proteine gefunden wurden, die durch Hepsin aktivierbar sind, ist dessen physiologische Funktion noch ungeklärt. Zu potentiellen Substraten zählen die Proformen der Blutgerinnungsfaktoren VII, IX und XII, der Urokinase, HGF, Matriptase, Proctasin, der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor und das Matrixprotein Laminin. Jedoch ist noch unbekannt, welche dieser Proteine tatsächlich relevante Substrate *in vivo* sind. Wahrscheinlich besitzt Hepsin eine wichtige Funktion bei der Entwicklung des normalen Hörens. Mäuse, die kein Hepsin exprimieren, weisen Abnormalitäten im Innenohr, reduzierte Myelin-Expression im Hörnerv und schwerwiegende Beeinträchtigungen des Hörens auf. Die genauen Mechanismen, die zu diesen Abnormalitäten führen, müssen allerdings noch untersucht werden [54].

Ein weiteres Mitglied dieser Subfamilie ist die Enteropeptidase, eine lange bekannte und sehr gut untersuchte Protease des Verdauungstraktes. Sie besitzt eine sehr ähnliche Struktur wie Hepsin, was jedoch erst durch die Klonierung der cDNA erkannt wurde. Enteropeptidase wird auf der Membran des Duodenums exprimiert, aktiviert und in das intestinale Lumen abgegeben. Dort aktiviert sie das Pankreasenzym Trypsinogen zu Trypsin, was wiederum andere Hydrolasen des Verdauungssystems, wie Chymotrypsinogen und Proformen der Carboxypeptidase, Elastase und Lipasen spaltet [42]. Die physiologische Bedeutung der verbleibenden Mitglieder, TMPRSS2-5 und MSPL (TMPRSS13) ist bis heute noch ungeklärt [42].

2.3 Die Matriptase-Subfamilie

Zur Matriptase-Subfamilie gehören drei sehr homologe Proteasen, Matriptase, Matriptase-2 und Matriptase-3 und eine Protease mit einer atypischen Mosaikstruktur, die Polyserase-1 [42]. Die *stem*-Regionen der Matriptase 1-3 sind alle sehr ähnlich aufgebaut. Einer SEA-Domäne folgen zwei CUB- und drei oder im Falle von Matriptase vier LDLA-Domänen. Der Aufbau der Polyserase-1 ist ein Sonderfall, ihrer kurzen Transmembrandomäne folgen eine einzelne LDLA-Domäne und drei gleichartig aufgebaute Proteasedomänen, wobei die C-terminale Domäne katalytisch inaktiv ist [51]. Als erstes Mitglied dieser Subfamilie konnte Matriptase in vielen Epithelzellen embryonaler oder adulter Gewebe identifiziert werden [42].

Matriptase-2, auch TMPRSS6 genannt, wird vorwiegend in der menschlichen Leber exprimiert, wobei jedoch auch geringere Expressionsraten in der Niere, im Uterus und im Nasenrachenraum gefunden wurden. Nach einer proteolytischen Spaltung innerhalb der zweiten CUB-Domäne der *stem*-Region, wird die aktive Protease rasch von der Zelloberfläche in das Medium von Zellkulturen sezerniert. Matriptase-2, die in der Leber exprimiert wird, wirkt als Suppressor des hepatischen Hormons Hepcidin, das wiederum das Eisen-Exportprotein Ferroportin auf Enterocyten und Makrophagen internalisiert, um die Eisenaufnahme zu reduzieren. Somit ist Matriptase-2 ein Schlüsselenzym der Eisenhemostase [54].

Die physiologische Funktion der übrigen Mitglieder dieser Unterfamilie ist bisher unbekannt. Die mRNA der Matriptase-3 konnte im Gehirn, in der Haut, den Augen, der Speicheldrüse, der Prostata, den Hoden, Ovarien und im Uterus nachgewiesen werden [42]. Die Vollängen-mRNA der Polyserase-1 wurde vorwiegend im Skelettmuskel, Herz, Niere, Leber, Placenta und Gehirn identifiziert. Eine kürzere Splicevariante, die nur die erste der drei Serinproteasedomänen beinhaltet, auch Serase-1B genannt, wurde in der Leber, im Darm, Pankreas, Hoden und in peripheren CD14+ - und CD8+ -Zellen im Blut gefunden [42].

2.4 HAT/DESC-Subfamilie

Alle Gene, die für die fünf Proteasen dieser Unterfamilie codieren, sind innerhalb eines Genclusters auf Chromosom 4 lokalisiert. Das lässt vermuten, dass sie ursprünglich durch Genduplikation aus einem gemeinsamen Vorläufer entstanden sind. Die *stem*-Regionen der Mitglieder aus dieser Unterfamilie weisen die einfachste modulare Struktur innerhalb der TTSPs auf, die lediglich aus einer *SEA*-Domäne direkt an der Zelloberfläche besteht. In der *SEA*-Domäne kommt es zu einer spontanen, post-translationalen konformationsbedingten Hydrolyse der Gly-Ser Peptidbindung innerhalb einer konservierten Sequenz, wobei die zwei entstehenden Peptide stark assoziiert bleiben [51].

Die physiologische Funktion der Proteasen, DESC 1-4, ist bis heute nur wenig untersucht. DESC-1 wird ausschließlich in Epithelzellen der Haut, der Prostata, des Ösophagus und in oralen Epithelzellen exprimiert. DESC-4 konnte in Epithelzellen einiger Organe, wie Gehirn, Colon, Herz, Leber, Lunge und Zunge identifiziert werden [42, 51].

Da wir uns im Rahmen dieser Arbeit mit den potentiellen hämagglutininspaltenden Enzymen beschäftigt haben, sollen die Proteasen TMPRSS2, Matriptase und HAT weiterführend beschrieben werden.

2.5 TMPRSS2

2.5.1 Einleitung

Das Gen der transmembranen Serinprotease TMPRSS2 (transmembrane protease, serine S1 member 2, Epitheliasin) wurde erstmals im Jahr 1997 auf dem humanen Chromosom 21, dem kleinsten menschlichen Chromosom, durch systematische *exon-trapping* Experimente identifiziert. Diese wurden zum besseren Verständnis der Trisomie 21 durchgeführt. Während des Experiments wurden auf Chromosom 21 mehr als 550 mögliche Exons identifiziert, wobei ein Exon eine hohe Homologie zu humanen Serinproteasen aufwies. Dieser Klon wurde in einen anderen Vektor eingebaut und schließlich mit spezifischen Primern die volllängen cDNA isoliert, die für ein Protein aus 492 Aminosäuren codiert [53], das in der Plasmamembran verankert ist. Im Menschen wird diese Protease vorwiegend in der Prostata, dem Pankreas und dem Dickdarm exprimiert, wobei die Expression der TMPRSS2 auch in der Lunge, der Leber und den Nieren nachgewiesen wurde [47, 55]. Jedoch ist ihre physiologische Bedeutung im Menschen bis heute noch nicht aufgeklärt [56].

2.5.2 Physiologie und Pathophysiologie der TMPRSS2

Experimente mit *knock-out* Mäusen haben gezeigt, dass diese sich ohne Auffälligkeiten bis zum Erwachsenenalter entwickeln und keine Veränderungen oder Abnormalitäten in der Histologie oder der Funktion der Organe aufgetreten sind [56]. Hierfür wurden *Tmprss2*^{-/-} Mäuse durch Veränderung des TMPRSS2-codierenden Gens generiert, indem die Exons 10 bis 13 rekombinant entfernt wurden, sodass die Aktivität der Serinproteasedomäne ausgeschaltet wurde. Mit Hilfe spezifischer Primer wurde anschließend durch quantitative PCR nachgewiesen, dass in diesen Mäusen keine Transkription des TMPRSS2 Gens mehr stattfindet, während die Transkription einiger anderer TTSPs in spezifischen Geweben, wie der Nieren oder der Prostata, nicht beeinflusst wurde. Deshalb wird vermutet, dass andere TTSPs den Verlust der TMPRSS2-Aktivität kompensieren können. Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zeigten die nachfolgenden Untersuchungen keine Unterschiede im Gesamtgewicht der Tiere, im

Gewicht der Nieren und anderer Organe. Zudem wurden keine Unterschiede oder Veränderungen in TMPRSS2-exprimierenden Geweben bei histologischen Untersuchungen im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet. Diese Resultate führen zu der Vermutung, dass nicht nur die Aktivität der Proteasedomäne, die hier ausgeschaltet wurde, sondern vielleicht auch die noch vorhandene extrazelluläre *stem*-Region einen wichtigen Beitrag zur Funktion einiger transmembranen Serinproteasen leistet [54, 56].

Mittels monoklonaler Antikörper gegen die Proteasedomäne wurden im Western Blot von TMPRSS2-exprimierenden 293T-Zellen zwei Proteinspezies mit unterschiedlichen Molekulargewichten von 70 und 35 kDa gefunden. Um zu prüfen, ob eine autokatalytische Spaltung stattfindet, wie für einige andere TTSPs beschrieben [44-46, 48-50], wurde durch Mutagenese die Aminosäure Serin 441 der katalytischen Triade gegen Alanin ausgetauscht, sodass die proteolytische Aktivität der Mutante nicht mehr gegeben war. In der Analyse der Expression in 293T-Zellen mittels Western Blot zeigte sich, dass bei der Mutante S441A im Gegensatz zum Wildtyp keine Spaltung der Protease zu beobachten war. Zur Bestimmung der Spaltstelle wurden anschließend die drei Argininreste in Position 240, 252 und 255, die nahe der Proteasedomäne lokalisiert sind, mittels Mutagenese durch Glutamine ersetzt, da aufgrund der Substratspezifität zu vermuten war, dass an einer dieser Stellen die Spaltung stattfinden könnte. Durch Western Blot Analyse der Expression der Mutanten in 293T-Zellen zeigte sich, dass bei der Mutante R255Q nur noch das Volllängenprotein von 70 kDa zu detektieren war (Abbildung 2.2).

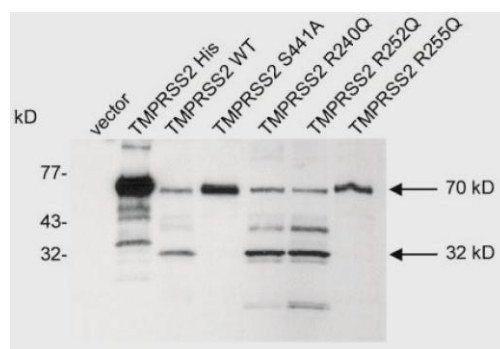


Abbildung 2.2. Western Blot Analyse der TMPRSS2-Mutanten mit spezifischen Antikörpern. 293T-Zellen wurden mit verschiedenen TMPRSS2-Mutanten transfiziert. Die katalytisch inaktive Mutante S441A zeigt keine Spaltung der 70 kDa TMPRSS2 in die lösliche Form mit einem Molekulargewicht von 32 kDa. Bei der Mutante R255Q wurde ebenfalls keine Spaltung beobachtet (Abbildung aus Afar et al. 2001 [47]).

Somit findet in Zellen und Geweben eine autokatalytische Spaltung der TMPRSS2 zwischen Arg255 und Ile256 statt, wodurch die aktive Protease gebildet wird [47]. Die nach der Spaltung immer noch membrangebundene TMPRSS2 kann jedoch teilweise in den extrazellulären Raum abgegeben werden [57].

Der Natriumtransport durch Epithelschichten ist ein wichtiger Schritt im menschlichen Körper zur Regulation zahlreicher physiologischer Funktionen. Unter anderem kann dadurch der Blutdruck über die Nieren und das *airway surface liquid volume* in der Lunge reguliert werden. Der Natriumtransport wird über Ionenkanäle gesteuert und reguliert. Der Amilorid-sensitive *epithelial sodium channel* (ENaC) wird durch systemische hormonelle Signale gesteuert und gewebspezifisch aktiviert. Um die Aktivierung des ENaC in der Lunge zu untersuchen und die im Menschen verantwortlichen Aktivatoren zu identifizieren, wurde mit Hilfe von RT-PCR und cDNA-Screenings nach Sequenzen gesucht, die eine hohe Homologie zur Serinprotease xCAP1 aus *Xenopus* aufweisen, für die gezeigt werden konnte, dass diese Natriumkanäle aktivieren kann [58]. Unter Verwendung von degenerierten Primern, basierend auf der Aminosäuresequenz von xCAP1, konnten mittels RT-PCR aus einer *airway* cDNA Bibliothek mit Protsin und TMPRSS2 zwei Proteasen identifiziert werden, die eine Homologie zu xCAP1 besitzen. Zur Untersuchung der ENaC-Aktivierung durch Protsin und TMPRSS2 wurden die cRNAs der Proteasen mit der cRNA des ENaC in Oocyten aus *Xenopus* coexprimiert und der Natriumeinstrom gemessen. Erstaunlicherweise zeigte sich, dass TMPRSS2 im Gegensatz zu Protsin, die Aktivität der ENaC bei cRNA Coexpression konzentrationsabhängig herabsetzt [59]. Ob diese Inhibierung auch *in vivo* in der Lunge stattfindet und das eine mögliche physiologische Bedeutung der TMPRSS2 sein könnte, muss in weiteren Studien untersucht werden.

Durch Wilson et al. wurde gezeigt, dass neben anderen Proteasen auch TMPRSS2 den PAR-2 Rezeptor *in vitro* aktivieren kann, der zur Gruppe der G-Protein gekoppelten Protease-aktivierbaren Rezeptoren gehört. Interessanterweise ist die Expression dieser Rezeptoren in vielen Tumorgeweben, einschließlich Prostata Tumoren, hochreguliert. Durch Aktivierung des PAR-2 Rezeptors werden die zwei Matrix-Metalloproteasen

MMP-2 und MMP-9 vermehrt in Tumorgeweben exprimiert, die Schlüsselpoteine für die Metastasierung von Tumoren sind [60].

Durch *cDNA microassays* konnte zudem eine erhöhte, androgenabhängige Transkription der TMPRSS2 mRNA in Prostatakrebszellen festgestellt werden [57]. Das ist darauf zurückzuführen, dass der humane Genpromotor der TMPRSS2 ein androgensensitives Element besitzt [47]. Die Expression der TMPRSS2 ist in allen androgenabhängigen Prostatakrebszelllinien gesteigert, wobei diese durch Zugabe eines Androgens sogar induzierbar ist [57]. In vielen Prostatakrebszellen wurde eine Fusion der TMPRSS2 mit Transkriptionsfaktoren gefunden, wobei das untranslatierte 5'-Ende des TMPRSS2-Gens mit den Genen der Transkriptionsfaktoren ERG oder ETV fusioniert. Durch die androgen-sensitive Promotorregion des TMPRSS2-Gens wird die Expression der Transkriptionsfaktoren erhöht und dadurch die Ausbreitung und Invasion der Prostatakrebszellen gesteigert. In molekularen Studien wurde gezeigt, dass eine unnormale Expression des Transkriptionsfaktors ERG die normale Signalkaskade des Androgenrezeptors unterbricht und epigenetische Programme aktiviert werden, die zu einer Tumorgenese führen [61]. Diese Tumorausbreitung ist jedoch nicht auf die TMPRSS2-Aktivität zurückzuführen, da die proteasecodierende Sequenz des TMPRSS2 Gens nicht an der Fusion mit Transkriptionsfaktoren beteiligt ist [62]. Aufgrund der erhöhten Expressionsrate in Prostatakrebszellen könnte TMPRSS2 ein Marker für die Diagnose und Behandlungskontrolle dieser Krebserkrankung sein. Ob es auch ein Target für eine Tumorthapie sein kann, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Bisher ist noch unklar, welche Rolle die proteolytische Aktivität der TMPRSS2 in der Tumorentstehung, Ausbreitung und Metastasierung spielt [63].

In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass Wirtszellproteasen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Oberflächenproteinen vieler Viren spielen. Deren Spaltung ist in vielen Fällen eine essentielle Voraussetzung für die Fusion der Viren mit ihrer Wirtszelle und demzufolge auch für die Virusvermehrung [33, 64, 65].

In Analogie zu Grippeviren (siehe Abschnitt 1.5) wird das Fusionsprotein F des humanen Metapneumovirus (HMPV) als einkettiges Oberflächenprotein synthetisiert und muss durch Proteasen der Wirtszellen gespalten und dadurch aktiviert werden, damit eine Virusausbreitung stattfinden kann. Dieses Virus verursacht vorwiegend bei

jungen Kindern schwerwiegende Entzündungen der Bronchien und Pneumonien. In einer Studie wurde gezeigt, dass TMPRSS2 ein effektiver Aktivator des HMPV F Proteins ist. Die Spaltstelle des F Proteins wird nicht von den ubiquitär vorkommenden furinartigen Proteasekonvertasen erkannt, kann aber auch durch Trypsin aktiviert werden. Durch Western Blot Analyse wurde gezeigt, dass in 293T-Zellen die Coexpression der TMPRSS2 mit dem Fusionsprotein F zu einer Aktivierung und Spaltung des F Proteins führt. In weiteren Untersuchungen zur Vermehrung von HMPV in Vero-Zellen wurde nachgewiesen, dass bei der Expression der TMPRSS2 ein multiples Wachstum und eine starke Vermehrung der Viren möglich wurde [64].

Das Fusionsprotein F des Parainfluenzavirus (HPIV) muss ebenfalls durch Wirtproteasen aktiviert werden [66]. Eine Infektion mit diesen Viren ist der zweithäufigste Grund für akute Atemwegserkrankungen, die zu Hospitalisierungen bei Kindern unter fünf Jahren führen. HPIV verursachen Bronchiolitis, Pneumonien und Pseudokrupp, wobei es zum Atemstillstand kommen kann [67]. In einer Untersuchung wurden Vero-Zellen mit einem Plasmid, das für TMPRSS2 codiert, coinfiziert und die Virusvermehrung mit Hilfe eines *plaque formation assays* analysiert. Dabei zeigte sich, dass alle verwendeten Subtypen des HPIV effizient in diesen Zellen ohne Zugabe von Trypsin replizieren. Durch nachfolgende Analyse der Zellüberstände mit Hilfe einer SDS-PAGE und anschließendem Western Blot wurde nachgewiesen, dass das Fusionsprotein F dieser Viren in Anwesenheit der TMPRSS2 effektiv gespalten wird [68].

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass auch das *spike S* Oberflächenprotein des SARS-CoV (*severe acute respiratory syndrome coronavirus*) durch die Proteasen Trypsin, Cathepsin L und Elastase aktiviert werden kann. Jedoch wurde vor kurzem nachgewiesen, dass auch TMPRSS2 das *spike S* Protein aktivieren kann. In Abwesenheit dieser Proteasen auf der Zelloberfläche dringen diese Viren mittels Endozytose in die Wirtszelle ein und das S Protein wird dann durch Cathepsin L im Endosom aktiviert [69]. Wenn allerdings zu den Zellen Proteasen wie Trypsin oder Elastase zugesetzt werden, wird das an den Rezeptor gebundene S Protein direkt auf der Zelloberfläche aktiviert, die Virusfusion mit der Zellmembran induziert und ein direkter Endosomen-unabhängiger Eintritt der SARS-CoV in die Zelle ermöglicht. Es wurde

gezeigt, dass TMPRSS2-exprimierende Vero-Zellen in Abwesenheit von Cathepsin L von SARS-CoV infiziert werden können und die Aktivierung des S Proteins auf der Zelloberfläche passiert. Jedoch findet diese Aktivierung durch TMPRSS2 ausschließlich auf der Zelloberfläche und nicht während der Virus-Replikation innerhalb der Wirtszelle statt. Es wird vermutet, dass die Spaltstelle des S Proteins erst nach der Rezeptorbindung und einem dadurch bedingten Konformationswechsel für TMPRSS2 zugänglich wird [65, 70, 71]. Dabei scheint die Spaltung des S Proteins durch TMPRSS2 den direkten Eintritt des SARS-CoV von der Zelloberfläche unabhängig einer Cathepsin L Aktivität im endosomalen Weg zu ermöglichen [65].

2.5.3 Artifizielle Substrate der TMPRSS2

Aus der Literatur sind nur wenige Daten zur Substratspezifität der TMPRSS2 bekannt (Abbildung 2.3). Wilson et al. bestimmten die katalytische Aktivität der in *E.coli* rekombinant hergestellten TMPRSS2 durch die Zugabe des Trypsinsubstrats Cbz-Gly-Gly-Arg-AMC. Unter Verwendung von 1,25 µg der aktiven TMPRSS2 wurde bei identischer Messzeit die gleiche Fluoreszenzzunahme, wie bei Einsatz von 0,5 ng Trypsin beobachtet. Demzufolge wird dieses Substrat unter den gleichen Bedingungen von TMPRSS2 deutlich schlechter als von Trypsin gespalten [60].

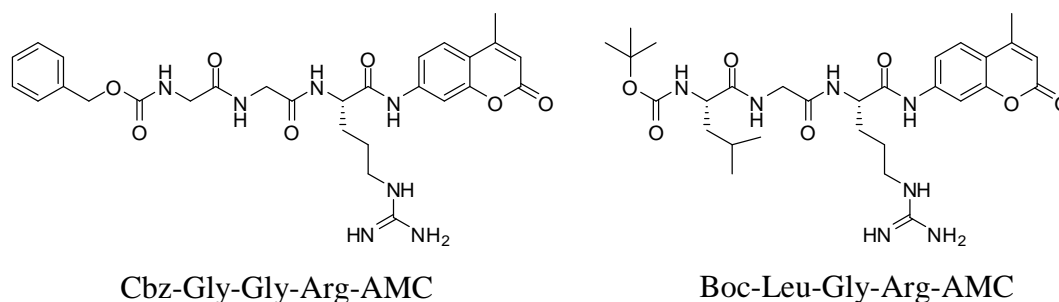


Abbildung 2.3. Strukturen der fluorogenen Substrate Cbz-Gly-Gly-Arg-AMC und Boc-Leu-Gly-Arg-AMC.

In einer anderen Arbeit wurde die enzymatische Aktivität der TMPRSS2 mit dem fluorogenen Substrat Boc-Leu-Gly-Arg-AMC bestimmt. Hierfür wurde die Protease in MDCK-Zellen exprimiert und ihre Aktivität auf der Zelloberfläche durch Substratzugabe und Messung der Fluoreszenzzunahme ermittelt [35], wobei jedoch auf der Zelloberfläche nur sehr geringe Aktivitäten nachweisbar waren. Jedoch wurden für beide Substrate die enzymkinetischen Parameter K_m und k_{cat} nicht bestimmt.

2.5.4 Inhibitoren der TMPRSS2

In Gegensatz zu vielen anderen gut charakterisierten trypsinartigen Serinproteasen sind aus der Literatur nur wenige Daten zur Hemmung der TMPRSS2 bekannt. So kann die Ausbreitung bestimmter Influenzaviren nach der Aktivierung des HAs in MDCK-Zellen, die TMPRSS2 exprimieren, durch die Zugabe des Ovomucoid-Trypsininhibitors [72], des unspezifischen irreversiblen Serinproteaseinhibitors Pefabloc® SC oder des 58 Aminosäure langen pankreatischen Trypsininhibitors Aprotinin gehemmt werden. Unter Verwendung von 50 µM Aprotinin wurde eine komplette Hemmung der Virusausbreitung beobachtet [73]. Jedoch wurde Aprotinin, das viele Jahre lang zur Reduktion von Blutverlusten bei Operationen am Herzen klinisch eingesetzt wurde, auf Grund von Nebenwirkungen 2008 vom Markt genommen [74]. In einer weiteren Arbeit wurde die Hemmung der TMPRSS2 durch den unspezifischen irreversiblen Trypsininhibitors Cbz-(carboxybenzyl)-phosphono-Lys(OPh)₂ beschrieben [60]. Allerdings wurden für diese Inhibitoren keine Hemmkonstante oder IC₅₀-Werte bestimmt.

2.5.5 Aktivierung der Influenza A-Viren durch TMPRSS2 und HAT

Wie bereits erwähnt (s. Abschnitt 1.5) zeigten frühe Studien in Zellkulturen, dass Influenzaviren mit monobasischer Schnittstelle im Hämagglutinin durch die Zugabe des Verdauungsenzyms Trypsin aktivierbar sind [32]. Jedoch war lang Zeit nur wenig über die möglichen Proteasen bekannt, die Influenzaviren unter natürlichen Infektionsbedingungen aktivieren. Auf der Suche nach solchen Proteasen aus menschlichen Atemwegsorganen konnten mit TMPRSS2 und HAT zwei Enzyme identifiziert werden, die das Oberflächenprotein Hämagglutinin spalten [33]. Hierfür wurde in humanen Lungenkrebszellen HA von H3N2-Viren mit jeweils einer Protease coexprimiert und die Zellüberstände mit Hilfe eines Western Blots mit spezifischen Antikörpern gegen H3N2 analysiert. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass bei Coexpression von HA mit TMPRSS2 oder HAT das Vorläuferprotein HA0 auch ohne Zugabe von Trypsin effizient in HA1 und HA2 gespalten wird (Abbildung 2.4). Als

Kontrolle wurde eine katalytisch inaktive Mutante der TMPRSS2, bei der das Serin441 im aktiven Zentrum durch Alanin ausgetauscht (S441A) wurde, analysiert. Mit dieser Mutante wurde keine Spaltung beobachtet [33].

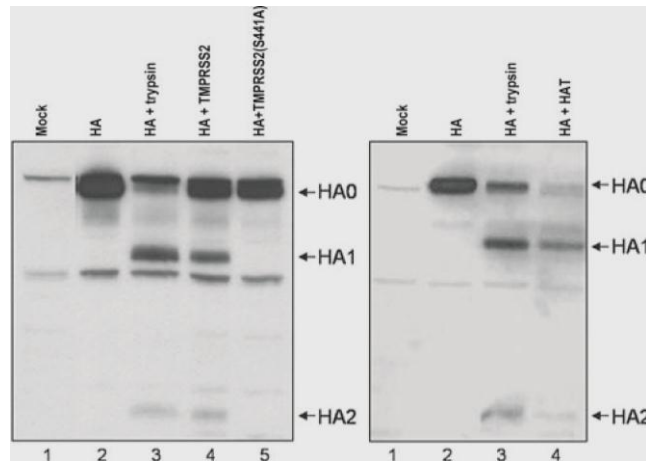


Abbildung 2.4. Western Blot Analyse der Spaltung des HA durch Coexpression mit den Proteasen TMPRSS2 (links) und HAT (rechts). (Abbildung aus Böttcher et al. 2006 [33]).

In weitergehenden Experimenten wurde untersucht, ob TMPRSS2 oder HAT in Abwesenheit von Trypsin die multizyklische Replikation der influenzaviren ermöglichen. So wurden MDCK-Zellen mit TMPRSS2 oder HAT transfiziert und mit Influenzaviren der Subtypen H1, H2 und H3 infiziert (Abbildung 2.5).

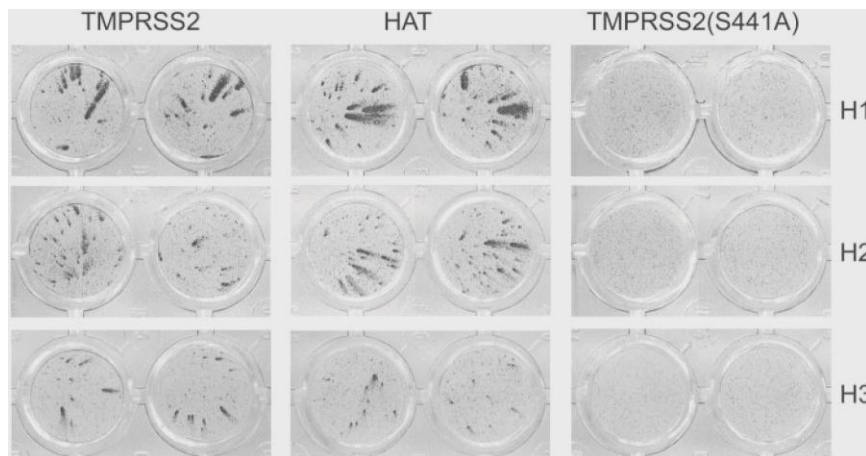


Abbildung 2.5. Multizyklische Replikation der Influenzaviren in MDCK-Zellen, die mit TMPRSS2 (links), HAT (Mitte) oder mit der katalytisch inaktiven Mutante S441A der TMPRSS2 (rechts) cotransfiziert wurden. Zehn Stunden nach Transfektion mit einem Protease-codierenden Plasmid wurden die Zellkulturen mit verschiedenen Influenza-Subtypen infiziert. Die kometenartigen Spots weisen auf eine multizyklische Virusvermehrung hin. Bei der inaktiven Mutante S441A können nur einzelne infizierte Zellen nachgewiesen werden. (Abbildung aus Böttcher et al. 2006 [33]).

In Kulturen, in denen entweder HAT oder TMPRSS2 exprimiert wurde, konnten die typischen kometenartigen Ausbreitungsmuster nachgewiesen werden, die aktivierte Viren und somit multizyklische Replikationen anzeigen. Im Gegensatz dazu konnten unter Verwendung der inaktiven TMPRSS2-Mutante S441A nur einzelne infizierte Zellen beobachtet werden [33]. Deshalb wurden für weitergehende Experimente MDCK-Zellen mit induzierbarer Expression der humanen Proteasen HAT und TMPRSS2 durch Zugabe von Doxycyclin etabliert [73].

Beide Proteasen werden sowohl als Vollängenproteine auf der Zelloberfläche exprimiert aber auch als prozessierte lösliche Formen an die extrazelluläre Umgebung abgegeben. Allerdings besitzt die membrangebundene Form der HAT eine deutlich höhere enzymatische Aktivität als ihre lösliche Form. Im Gegensatz dazu konnte im Fall der TMPRSS2 weder bei der membrangebundenen noch bei der löslichen Form eine deutliche Enzymaktivität nachgewiesen werden. Zudem wurde gezeigt, dass die proteolytische Aktivierung der eintretenden Viren durch die membrangebundene Form der HAT auf der Zelloberfläche möglich ist, jedoch TMPRSS2 die Aktivierung des HA in diesem Stadium des Zelleintritts nicht unterstützt. Demzufolge gilt es als gesichert, dass TMPRSS2 HA innerhalb der Zelle spaltet [35].

2.6 Matriptase

2.6.1 Einleitung

Die transmembrane Serinprotease Matriptase wurde zuerst im Jahr 1993 aus einem konditionierten Medium einer Brustkrebszelllinie isoliert [75]. Ihr Gen ist auf dem humanen Chromosom 11 lokalisiert und codiert für ein Polypeptid aus 855 Aminosäuren. Die Protease ist ein 80-90 kDa großes Zelloberflächenprotein mit einer mosaikartigen Domänenstruktur und wird in nahezu allen embryonalen und adulten Epithelgeweben und in Zellen des Immunsystems einschließlich Mastzellen, Monocyten und Makrophagen exprimiert. Orthologe der Matriptase konnten in den Genomen aller Säugetiere identifiziert werden, was auf eine konservierte evolutionäre Funktion hindeutet [54].

Matriptase besitzt einen kurzen N-Terminus im Cytoplasma, gefolgt von einer kurzen transmembranen Sequenz und einer große extrazelluläre Domäne, die die Proteasedomäne beinhaltet. Auch diese Protease wird als inaktives einzelsträngiges Zymogen synthetisiert, für deren Aktivierung zwei proteolytische Spaltungen notwendig sind. Die erste Spaltung erfolgt innerhalb der SEA-Domäne im endoplasmatischen Retikulum oder Golgi-Apparat. Nach dieser Spaltung liegt Matriptase im Komplex mit ihrem endogenen Inhibitor (HAI-I) vor und wird zusammen mit diesem zur Zelloberfläche transportiert [76, 77]. Der zweite Aktivierungsschritt ist, wie bei der verwandten Protease TMPRSS2, ein autokatalytischer Prozess, der innerhalb der katalytischen Domäne erfolgt. Diese Autoaktivierung wird wahrscheinlich durch posttranslationäre Modifikationen und durch die Lokalisation auf der Zelloberfläche gesteuert, wobei die genauen Mechanismen noch nicht vollständig geklärt sind [42, 54].

2.6.2 Physiologie und Pathophysiologie der Matriptase

Matriptase wird nahezu ubiquitär im menschlichen Körper exprimiert und ist für die korrekte Ausbildung, Differenzierung und Funktion der Haut essentiell. *Knock-out* Mäuse sterben kurze Zeit nach der Geburt auf Grund einer beeinträchtigten Funktion der epidermalen Wasserbarriere, die zu unkontrollierter Dehydration und Hypothermie führt. Zudem werden durch fehlende Matriptasefunktion folliculäre Strukturen beeinflusst [51]. Weitere Studien lassen vermuten, dass Matriptase über Aktivierung der GPI-verankerten Serinprotease Prostasin Teil einer epidermalen proteolytischen Kaskade ist, die epidermale Differenzierungen ermöglicht. Eine seltene Hauterkrankung, Ichtirosis, wird auf eine Reihe von Mutationen auf dem humanen ST14 Gen, das für Matriptase codiert, zurückgeführt. Patienten, die unter einer milden bis moderaten Form der Ichtirosis erkranken, leiden unter einer gestörten Barrierefunktion der Haut und vermindertem Haarfollikelwachstum, was zu brüchigen, trockenen, dünnen und langsam wachsenden Kopfharen führt. Matriptase wird fast immer mit den Kunitz-Typ Serinproteaseninhibitoren HAI-1 und HAI-2 coexprimiert. Der Verlust dieser Inhibitoren führt zu fatalen epidermalen Dysfunktionen in Mäusen [42, 54].

Matriptase wird bei einer Reihe von Tumoren, z.B. der Prostata, Ovarien, Niere, des Colons und Ösophagus verstärkt exprimiert, wodurch sie mittlerweile als Target für die Krebstherapie angesehen wird [51]. In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass Matriptase einige Proteine aktivieren kann, die mit einer malignen Ausbreitung in Zusammenhang stehen. Dazu zählen die Proformen des *Hepathocyte growth factor* (pro-HGF), des Macrophagen-stimulierenden Proteins (pro-MSP-1), Urokinase (pro-uPA) und des PAR-2. Aktivierter HGF und uPA spielen eine wichtige Rolle beim invasiven Wachstum von Tumoren, einem komplexen biologischen Prozess, bei dem es zur Zellproliferation, Zerstörung von Zell-Zell-Kontakten und Zellmigration kommt. Die Serinprotease Urokinase ist ein Teil des Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Systems, das zusätzlich aus dem Zelloberflächen-assoziiertem Rezeptor uPAR, den beiden Plasminogenaktivator-Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 sowie dem Zymogen Plasminogen besteht. Urokinase aktiviert Plasminogen zu Plasmin, wobei Plasmin einerseits für die Fibrinolyse verantwortlich ist, aber auch zum Abbau der extrazellulären Matrix beiträgt und einige Wachstumsfaktoren und Matrix-

Metalloproteasen (MMPs) aktiviert. Das uPA/Plasminogen-System hat große Bedeutung bei den Prozessen des Gewebewiederaufbaus, bei Invasivität und Angiogenese und ist in Krebszellen oft hochreguliert [78, 79].

HGF, auch als *scatter*-Factor bezeichnet, bindet an den Tyrosinkinase-Rezeptor Met, der vom c-met proto-Oncogen codiert wird und löst dadurch mitogene, motogene und morphogene Funktionen in verschiedenen Zelltypen aus. Durch die Rezeptorbindung werden multiple Signalwege induziert, die die Regulierung der Expression und die Aktivierung von Genen für ein invasives Wachstum beeinflussen [80]. In einigen Studien wurde gezeigt, dass HGF und Met eine wichtige Rolle bei der Tumorgenese, der Invasion, der Differenzierung und der Tumorangiogenese spielen, die jedoch durch die Hemmung von HGF oder Met drastisch reduziert werden. In diesem Signalweg ist die Aktivierung des HGFs der limitierende Schritt. Bis heute konnten sieben Proteasen identifiziert werden, die bei dieser Aktivierung beteiligt sein könnten, unter anderem auch Matriptase. Die Matriptase-abhängige Aktivierung von pro-HGF auf der Zelloberfläche ist entscheidend für die weiteren biologischen Reaktionen, die durch diesen Wachstumsfaktor hervorgerufen werden. Somit ist Matriptase durch die Kontrolle der Aktivität von uPA und HGF ein primärer Bestandteil in den Aktivierungskaskaden für invasives Wachstum von Tumorzellen. Daneben spaltet Matriptase auch Fibronektin und Laminin, beide Proteine sind Bestandteile der extrazellulären Matrix, die Zellanlagerungen und Migration vermitteln. Matriptase ist außerdem in der Lage PAR-2 zu aktivieren. Dieser Rezeptor spielt eine zentrale Rolle bei der Zelladhäsion und bei frühen inflammatorischen Prozessen [78].

2.6.3 Inhibitoren der Matriptase

In der Literatur wurden viele Inhibitoren der Matriptase beschrieben, die wirksamsten Verbindungen sind in Abbildung 2.6 dargestellt.

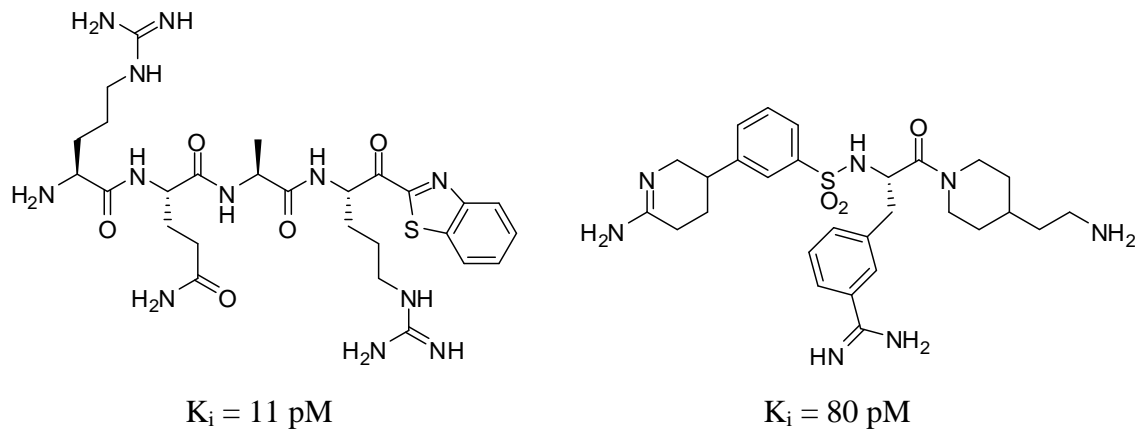


Abbildung 2.6. Strukturen der wirksamsten Matriptaseinhibitoren.

Der substratanaloge Inhibitor mit dem Benzothiazolketon-Anker hemmt Matriptase mit einem K_i -Wert von 11 pM [81]. Der tribasische 3-Amidinophenylalanin-Matriptase Inhibitor hat eine Hemmkonstante von 80 pM [82].

2.7 HAT - human airway trypsin like Serinprotease

2.7.1 Einleitung

Die Serinprotease HAT konnte erstmals 1997 als 28 kDa große Protease aus dem Sputum von Patienten mit chronischen Atemwegserkrankungen isoliert werden. Ihre cDNA codiert für ein Membranprotein mit 418 Aminosäuren und einer Masse von etwa 46 kDa, das auch in prozessierter, löslicher Form von der Zelloberfläche abgegeben werden kann. HAT wird vorwiegend in bronchialen und ösophagealen zilienträgenden Epithelzellen exprimiert. Ihre mRNA konnte jedoch auch in einigen anderen Geweben, wie Gehirn, Haut, Zunge, Hoden, Prostata, Blase und in Organen des Gastrointestinaltrakts gefunden werden [54].

2.7.2 Physiologie und Pathophysiologie der HAT

Bis heute sind nur wenige Informationen über die physiologische Funktion und *in vivo* Substrate der HAT bekannt. Es konnte eine erhöhte Expression und Enzymaktivität bei Patienten, die unter Asthma oder chronisch, entzündlichen Atemwegserkrankungen leiden, nachgewiesen werden. In *in vitro* Studien und zellbasierten Tests wurde gezeigt, dass HAT eine wichtige Funktion bei der respiratorischen Homeostase während einer Entzündung spielt, da sie die Genexpression von Mucin in Epithelzellen und Keratinozyten steigert. HAT ist auch bei der Abscheidung von Fibrin im Lungengewebe beteiligt, kann PAR-2 aktivieren und den Urokinaserezeptor proteolytisch inaktivieren [42, 51, 54].

2.7.3 Inhibitoren der HAT

Die wirksamsten Inhibitoren der HAT sind in Abbildung 2.7 dargestellt. Von einer polnischen Arbeitsgruppe wurden einige peptidische Inhibitoren mit C-terminalem Arginal-Rest beschrieben [83]. Eine verbesserte Hemmwirkung wurde für einige Derivate aus einer Serie von peptidischen 4-Amidinobezylamiden bestimmt. Die wirksamste Verbindung inhibiert HAT mit einem K_i -Wert um 15 nM [84].

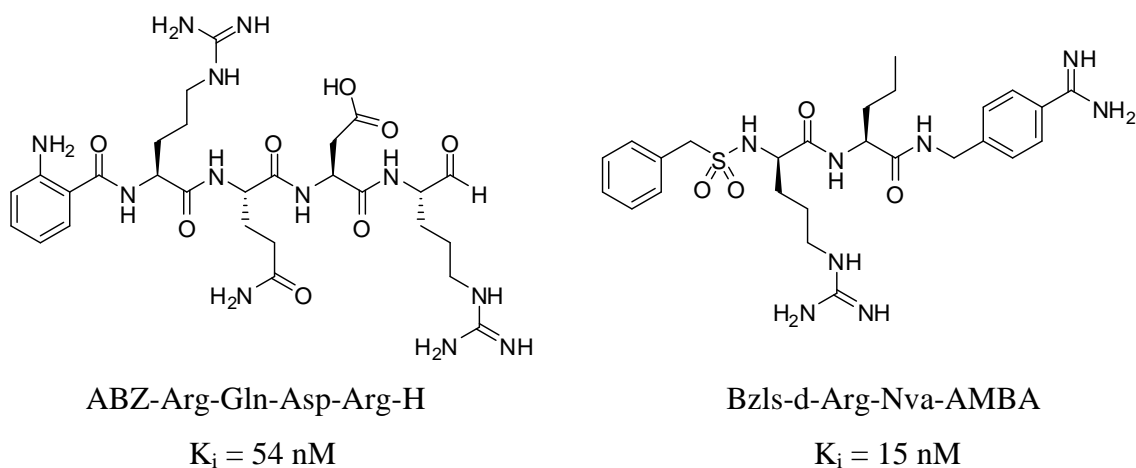


Abbildung 2.7. Strukturen substratanaloger Inhibitoren der HAT.

3 Ziel der Arbeit

Eine Infektion mit Influenzaviren führt auch heute meist zu Erkrankungen der oberen Atemwege mit einem erheblichen Krankheitsgefühl der betroffenen Patienten. Da die momentan verfügbaren Arzneistoffe zur Behandlung alle gegen viruseigene Strukturen gerichtet sind (vgl. Kapitel 1.7), können sich auf Grund des Selektionsdrucks schnell Resistenzen gegen diese Wirkstoffe entwickeln. Seit einiger Zeit ist bekannt, dass die trypsinartigen Wirtsproteasen TMPRSS2, HAT und Matriptase das Hämagglutinin verschiedener Influenzaviren aktivieren können. Dieser Schritt ist essentiell für die Virusvermehrung. Deshalb sind diese Proteasen potentielle Targets für die Entwicklung neuer Medikamente zur Behandlung der Grippe. Ein großer Vorteil einer solchen Therapie sollte die Vermeidung der raschen Ausbildung von Resistenzen sein, da nicht wie bei viralen Targets zu erwarten ist, dass die Proteasen mutieren.

Im Verlauf dieser Arbeit sollten

- Plasmide kloniert werden, die eine Expression der katalytischen Domänen der Serinproteasen TMPRSS2 und HAT in *E.Coli* ermöglichen,
- die katalytischen Domänen der Serinproteasen TMPRSS2, HAT und Matriptase in *E.Coli* überexprimiert, gereinigt und aktiviert werden,
- ein enzymkinetischer Test für die TMPRSS2 etabliert werden, um im weiteren Verlauf enzymkinetische Parameter von potentiellen Substraten und Hemmkonstanten von Inhibitoren untersuchen zu können,
- die aus der Expression erhaltene katalytische Domäne der TMPRSS2 grundlegend enzymatisch in Bezug auf ihre Substratspezifität charakterisiert werden, da bis jetzt in der Literatur nur sehr begrenzte Daten verfügbar sind,
- und die Hemmung der TMPRSS2 durch zwei verschiedene Inhibitortypen untersucht werden. Zunächst sollten substratanaloge Hemmstoffe geprüft werden, da für diesen Inhibitortyp bei anderen trypsinartigen Serinproteasen, wie HAT [84], Thrombin [85], Faktor Xa [86] und Urokinase [87] bereits eine starke Hemmung beschrieben wurde. Weiterhin sollte die Hemmung der vom 3-Amidinophenylalanin-abgeleiteten Inhibitoren untersucht werden, die potente

Hemmstoffe der verwandten Serinproteasen Matriptase, Urokinase und Thrombin sind [88, 89].

- die Hemmung der Ausbreitung von Influenzaviren in Zellkulturen durch ausgewählte Inhibitoren in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Garten und Dr. Böttcher-Friebertshäuser am Institut für Virologie an der Philipps-Universität Marburg untersucht werden,
- ein Homologiemodell der TMPRSS2 erstellt werden, das mit einer bekannten Kristallstruktur der verwandten Protease Thrombin im Komplex mit einem Inhibitor vom 3-Amidinophenylalanin-Typ, der auch TMPRSS2 sehr wirksam hemmt, überlagert werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Inhibitoren wurden in unserem Arbeitskreis synthetisiert, eine Übersicht ist im Anhang angegeben. Die geprüften Substrate sind kommerziell erhältlich oder wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmals synthetisiert.

4.1 Konstruktion der Expressionsplasmide pET24(b)-TMPRSS2 und pET24(b)-HAT und der Plasmide für Mutanten der TMPRSS2

Die Expressionsplasmide für die Proteasen TMPRSS2 und HAT wurden analog des publizierten Expressionsplasmids der verwandten Protease Matriptase designt [90].

Die Zielgene der katalytischen Domänen der TMPRSS2 und HAT wurden aus den Vektoren pCAGGS-TMPRSS2 und pCAGGS-HAT (s. Abbildung A.3-A.6), die in der Arbeitsgruppe Garten hergestellt wurden [33], durch PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer (s. Tabelle 6.5) wurden so gewählt, dass jeweils am 5'-Ende eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym NdeI- und am 3'-Ende eine für EcoRI eingeführt wurde (s. Abbildung A.7.-A.9). Um eine effiziente affinitätschromatographische Reinigung der Proteasen zu ermöglichen, wurde durch die verwendeten Primer am 5'-Ende zusätzlich die Sequenz Met-Lys-(His)₆ eingeführt. Zudem resultiert dadurch nach der Aktivierung der essentielle der freie Rest Ile16 (s. 4.2.2). Die so erhaltenen Zielgene wurden in den Expressionsvektor pET24(b) (Novagen) eingeführt, durch den die rekombinante Expression der Proteasen in *E.coli* ermöglicht wird.

Wie bereits in Kapitel 2.1 beschrieben, besitzen alle trypsinartigen Serinproteasen innerhalb ihrer katalytischen Domäne sechs hochkonservierte Cysteine, die drei Disulfidbrücken ausbilden. Zusätzlich enthalten alle Proteasen ein hochkonserviertes Cystein in Position 122, das eine Disulfidbrücke mit einem Cystein ausbildet, das sich N-terminal der katalytischen Domäne befindet, sodass die Proteasedomäne auch nach der Aktivierung noch kovalent an die *stem*-Region gebunden ist (vgl. Abbildung 2.1 a).

Jedoch weist die Aminosäuresequenz der TMPRSS2, siehe Abbildung 4.1, noch ein weiteres Cystein in Position 136 auf, das keine Disulfidbrücke ausbildet.

chymotrypsin_A	STAAFSQTVSAVCLP---SASDDFAAGTTCVTTGWG-----LTRYTNANTPDLQQASL	160
HAT	ENSVTFTKDIHSVCLP---AATQNIIPPGSTAYVTGWG-----AQEYA-GHTVPELRQGGV	143
TMPRSS2	QKPLTFNDLVKPVCLP---NPGMMLQPEQLCWISGWG-----ATEEK-GKTSEVLNAAKV	147
Matriptase	EKPAEYSSMVRPICLP---DASHVFPAGKAIWVTGWG-HT----QYG-GTGALILQKGEI	155
	... : * . . : . * * * * . : . : * * * * * . : .	

Abbildung 4.1. Ausschnitt der Aminosäuresequenzen des Chymotrypsins und der trypsinartigen Serinproteasen HAT, TMPRSS2 und Matriptase. In Position 136 besitzen Chymotrypsin und TMPRSS2 ein zusätzliches Cystein, das keine Disulfidbrücke ausbildet.

Für die enzymatische Aktivität der Protease sind eine richtige Faltung und die korrekte Ausbildung der Disulfidbrücken essentiell. Durch das Vorhandensein von zwei zusätzlichen Cystein-Seitenketten wird die korrekte Ausbildung der Tertiärstruktur erschwert. Deshalb wurden zwei weitere Mutanten der TMPRRS2 designt, bei denen die Cystein-Reste durch Serin mittels ortsgerichteter Mutagenese ausgetauscht wurden. In Abbildung 4.2 sind Ausschnitte der Protein- und Nucleotidsequenz der TMPRSS2 dargestellt, sowie der verwendete Primer für die Mutation des Cys122 in einen Serin-Rest angegeben.

		122
	Leu Val Lys Pro Val	Ser Leu Pro Asn Pro Gly ¹²⁷
Primer	5'-CTA GTG AAA CCA GTG	TCT CTG CCC AAC CC-3'
TMPRSS2	5'-GAC CTA GTG AAA CCA GTG	TGT CTG CCC AAC CCA GGC-3'
	Leu Val Lys Pro Val	Cys Leu Pro Asn Pro Gly ¹²⁷

Abbildung 4.2. Sequenzausschnitt der TMPRSS2, Sequenz des PCR-Primers TMPRSS2_122f und die entsprechenden Aminosäuresequenzen für die ortsgerichtete Mutagenese des Cysteins in Serin in Position 122.

4.2 Heterologe Produktion, Reinigung, Rückfaltung und Aktivierung der rekombinanten TMPRSS2

4.2.1 Expression der TMPRSS2

Die katalytische Domäne der trypsinartigen Serinprotease TMPRSS2 wurde, wie oben beschrieben und im Anhang dargestellt, kloniert und in den *E.coli*-Expressionstamm BL21 CodonPlus(DE3)-RILP transformiert. Zunächst wurde die optimale Wachstumstemperatur und –dauer nach Induktion der Zielexpression untersucht. Die in Tabelle 4.1 zusammengefassten Untersuchungen zeigen, dass eine Expression der TMPRSS2 für 3 Stunden bei 37 °C zur höchsten Ausbeute führte, wenn vor der Induktion die Bakterien bei 37 °C für drei Stunden inkubiert wurden.

Tabelle 4.1. Ausbeuten der TMPRSS2-Expression aus 2 L Kultur bei verschiedenen Bedingungen.

Temperatur	Induktionsdauer	Menge TMPRSS2* aus 2 L Kultur
15 °C	12 h	15 mg
30 °C	6 h	20 mg
37 °C	3 h	32 mg

* Bestimmung der UV-Absorption bei 254 nm.

Da das Protein in Form von unlöslichen *inclusion bodies* erhalten wurde, war es nach erfolgtem Zellaufschluss mittels Ultraschall notwendig, durch waschen mit *inclusion body*-Puffer und anschließender Zentrifugation, die Zellfragmente vom gewünschten Protein zu trennen. Um natives und richtig gefaltetes Protein zu erhalten, mussten die *inclusion bodies* in einem Harnstoffpuffer (Lysepuffer I, s. Tabelle 6.3) zunächst denaturiert werden, sodass die tertiäre Struktur der TMPRSS2 aufgelöst wird. Das denaturierte Polypeptid wurde mittels Affinitätschromatographie unter Verwendung einer Ni-NTA-Säule (Qiagen) gereinigt. Nachdem unspezifisch an die Affinitätsmatrix gebundenes Protein bei pH-Wert 6,3 mit Lysepuffer II entfernt worden war, wurde die über einen (His)₆-Tag gebundene TMPRSS2 mit Lysepuffer III bei pH-Wert 4,5 von der Säule eluiert (Abbildung 4.3). Für die Denaturierung in Lysepuffer I ist ein relativ

großes Puffervolumen von ca. 50 mL nötig. Die Proteinlösung konnte jedoch mittels des vorhandenen Äkta-Systems nur in 10 mL Schritten auf die Säule aufgetragen werden. Um die mehrfache Auftragung der TMPRSS2 zu vermeiden, wurde das in Lysepuffer I denaturierte Polypeptid direkt mit einer Peristaltikpumpe auf die Säule aufgetragen, wobei die Elution des Durchflusses nicht detektiert wurde. In Abbildung 4.3 ist nur das Chromatogramm der TMPRSS2-Elution bei pH 4,5 gezeigt, die an einem Äkta-System erfolgte.

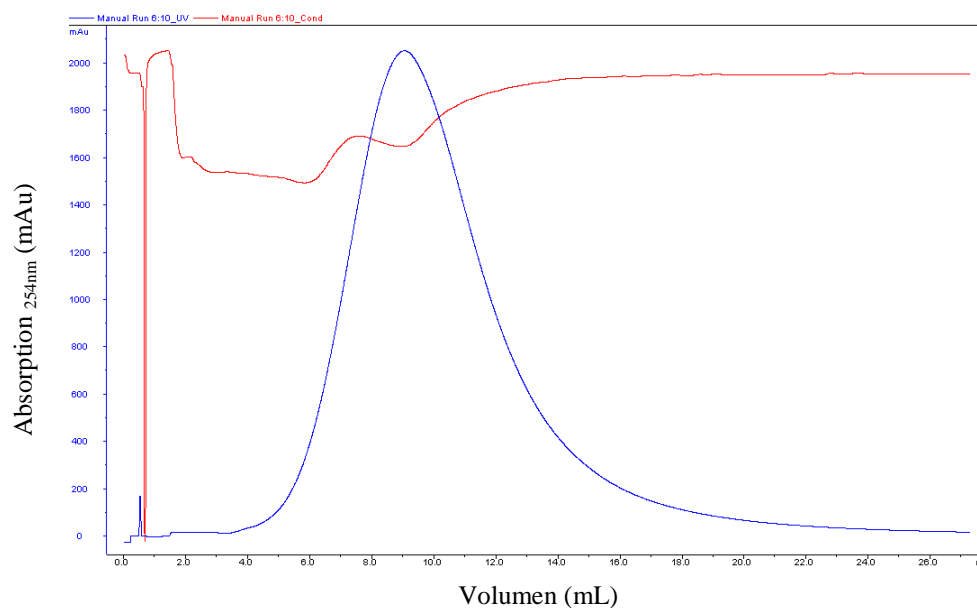


Abbildung 4.3. Chromatogramm der Affinitätschromatographie zur Reinigung der TMPRSS2-Präparation mittels einer Ni-NTA-Säule. Blau: UV-Absorption bei 254 nm; rot: Leitfähigkeit des Eluats. Die Elution erfolgte bei einem pH-Wert von 4,5.

In Abbildung 4.4 ist die SDS-PAGE und anschließende Coomassiefärbung der Präparation der TMPRSS2 dargestellt. Nach der Induktion der Proteinexpression (I_1) ist eine Proteinbande bei den erwarteten 26 kDa sichtbar, die vor der Induktion der Proteinexpression (I_0) nicht zu erkennen ist. Dies zeigt eindeutig, dass die gewünschte Expression der TMPRSS2 erst nach der Induktion erfolgt. Das Eluat der Affinitätschromatographie (E) zeigt die gereinigte TMPRSS2. Die aktivierte TMPRSS2 (s. Abschnitt 4.2.4) wurde ebenfalls auf das Gel aufgetragen, jedoch war die Konzentration zu gering, um mit Coomassie angefärbt zu werden.

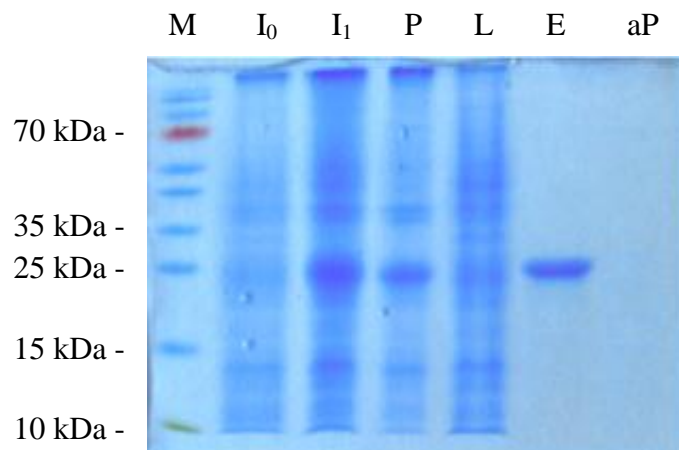


Abbildung 4.4. SDS-PAGE und Coomassiefärbung der Expression und Reinigung der rekombinanten TMPRSS2 (Marker (M), Gesamtzelllysate vor Induktion (I_0), Gesamtzelllysate 3 h nach Induktion (I_1), unlösliche Fraktion des Zelllysats (P), lösliche Fraktion des Zelllysats (L), Eluat von der Ni-NTA-Säule mit Lysepuffer III bei pH 4,5 (E) und aktivierte TMPRSS2 (aP), die Konzentration an aktivierter TMPRSS2 ist für eine Coomassiefärbung zu gering. Das aus der Aminosäuresequenz berechnete Molekulargewicht beträgt 26 kDa, eine Bande ist deutlich bei der entsprechenden Laufhöhe sichtbar.

4.2.2 Renaturierung mittels *rapid dilution* Methode

Die Entwicklung der rekombinanten DNA-Techniken öffnete ein neues Feld der Proteinproduktion in der Forschung und Industrie [91]. Jedoch führt die Überexpression von Genen in *E.coli* oft zur Bildung von nicht löslichen *inclusion bodies* [92]. Somit war es notwendig, spezifische Methoden und Strategien zur Gewinnung des aktiven Enzyms zu entwickeln.

Die Renaturierung der TMPRSS2 erfolgte mit Hilfe der *rapid dilution* Methode [90]. Hierfür wurde das über die Affinitätschromatographie gereinigte Protein in das 50-fache Volumen des Renaturierungspuffer I unter ständigem Rühren eingetropft. Der Renaturierungsansatz wurde für drei Tage ohne zu Rühren bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Rückfaltungspuffer über eine Tangentialmembran (cut-off 10 kDa, Satorius) aufkonzentriert. Die bei den initialen Versuchen verwendeten Bedingungen, die für die Rückfaltung der analogen Matriptase beschrieben waren [90], lieferten nur sehr geringe Ausbeuten an renaturiertem Protein. Deshalb wurde versucht die Zusammensetzung des Puffers für die TMPRSS2 zu optimieren. Hierfür wurden die Tris-, CaCl_2 - und EDTA-Konzentration konstant gehalten und jeweils eine Konzentration der verbleibenden Komponenten variiert (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2. Variationen der L-Arginin-, NaCl- und Brij 58-Konzentration im Rückfaltungspuffer (konstante Bestandteile: 50 mM Tris, pH 7,5, 20 mM CaCl₂, 1 mM EDTA).

L-Arginin HCl	NaCl	Brij 58
0,5 M	100 mM	0,05 %
0,5 M	250 mM	0,05 %
0,5 M	500 mM	0,05 %
0,5 M	1,0 M	0,05 %
1,0 M	100 mM	0,05 %
1,0 M	250 mM	0,05 %
0,5 M	100 mM	0,10 %
0,5 M	250 mM	0,10 %

Bei den untersuchten Variationen lieferten die Bedingungen in Zeile eins mit dem Zusatz von 0,05 % Brij 58 das beste Ergebnis. Hierbei bildeten sich nur geringe Mengen an ausgefallenem Protein und es konnte am Ende der Reinigung aktive TMPRSS2 gewonnen werden. Diese Präparation wurde für die nachfolgenden enzymkinetischen Untersuchungen verwendet. Ein exakter Vergleich der Rückfaltungsbedingungen durch direkte Aktivitätsmessungen ist allerdings nicht möglich, da die TMPRSS2 durch die N-terminale Modifikation noch in inaktiver Form vorliegt und erst in einem nachfolgenden Schritt proteolytisch aktiviert wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur die wesentlichen Parameter des Rückfaltungspuffers variiert. Damit war es jedoch nicht gelungen, die Rückfaltungsbedingungen zu optimieren. Mit den in Zeile 1 der Tabelle 4.2 genannten Bedingungen wurden aus 2 L Kultur 0,4 mg aktive TMPRSS2 erhalten. Diese Präparation reichte jedoch aus, um die Versuche zur Charakterisierung durchzuführen. Die relativ geringe Ausbeute an rückgefalteter TMPRSS2 könnte möglicherweise durch optimale Rückfaltungsbedingungen weiter verbessert werden. Da die Renaturierung von Proteinen eine große Bedeutung in der Biochemie spielt [91], sind mittlerweile Renaturierungs-Screens kommerziell erhältlich, mit denen geeignete Pufferbedingungen für eine erfolgreiche Renaturierung ermittelt werden können. Jedoch ist es im Fall der TMPRSS2 mit dem verwendeten Expressionssystem nicht möglich, diese Screens

durchzuführen, da für deren Testung sofort nach der Renaturierung aktives Protein erforderlich ist. Im Falle der trypsinartigen Serinprotease TMPRSS2 ist für die enzymatische Aktivität N-terminal ein freies Isoleucin in Position 16 der katalytischen Domäne erforderlich. Bei dem verwendeten Expressionsplasmids wird jedoch die Sequenz Met-Lys-(His)₆ N-terminal dem Ile16 vorangestellt, die nach der Renaturierung zur Erlangung der enzymatischen Aktivität abgespalten werden muss. Die Verwendung eines C-terminalen His-Tags wäre auch möglich, jedoch müsste auch bei solch einem Konstrukt auf jeden Fall ein Aktivierungsschritt der TMPRSS2 vor dem Rest Ile16 erfolgen, da bei der Expression in *E.coli* N-terminal immer ein Methionin als Startamino-säure in Proteine eingebaut wird. So müsste eine neue Aktivierungsmethode der TMPRSS2 etabliert werden. Demzufolge würde man auch mit solch einem veränderten Konstrukt bei der Verwendung eines Renaturierungs-Screens nicht sofort einen Hinweis erhalten, ob die Rückfaltung erfolgreich verlaufen ist.

4.2.3 Renaturierung mittels einer Ni-NTA-Säule

Die Rückfaltung eines rekombinanten Proteins ist in vielen Fällen ein limitierender Schritt zur Gewinnung nativer Proteine. Zur Optimierung der Renaturierung der TMPRSS2 wurde versucht, eine Alternative zur *rapid dilution* Methode zu etablieren. Ein Vorteil einer Proteinrenaturierung mittels chromatographischer Verfahren ist die gleichzeitige Kombination der Rückfaltung mit der Reinigung des Proteins [93]. Dabei wird durch die Immobilisierung und die effektive Trennung des Proteins auf der Matrix versucht, intermolekulare Interaktionen zu minimieren, die zu einer Aggregation des Proteins führen können. Es gibt mehrere Beispiele, bei denen mit dieser Methode die Ausbeute von nativem Protein gesteigert werden konnte [94].

Zur Renaturierung der TMPRSS2 wurde die Protease wie oben beschrieben exprimiert und die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Die so erhaltenen *inclusion bodies* wurden in Denaturierungspuffer I gelöst und mit der Matrix einer Ni-NTA Säule (XR 16/20, GE Healthcare) gemischt, sodass eine gleichmäßige Verteilung der TMPRSS2 erreicht wurde. Nach luftblasenfreiem Schließen der Säule wurde auf Denaturierungspuffer II gewechselt.

Die Rückfaltung erfolgte über Nacht bei 4 °C, indem durch einen linearen Gradienten über 35 Säulenvolumen auf Renaturierungspuffer II gewechselt wurde, der keinen Harnstoff enthält (schematische Abbildung 4.5).

Die Seitenketten der Cysteine im Protein liegen nun auf Grund der reduzierenden Bedingungen im Renaturierungspuffer II, der reduziertes Glutathion enthält, als SH-Gruppen vor. Für eine native Faltung der TMPRSS2 ist es erforderlich, dass die Disulfidbrücken zwischen diesen Cysteinen richtig ausgebildet werden. Hierfür wurde zu Renaturierungspuffer III mit oxidierenden Bedingungen durch einen linearen Gradienten über 10 Säulenvolumen gewechselt.

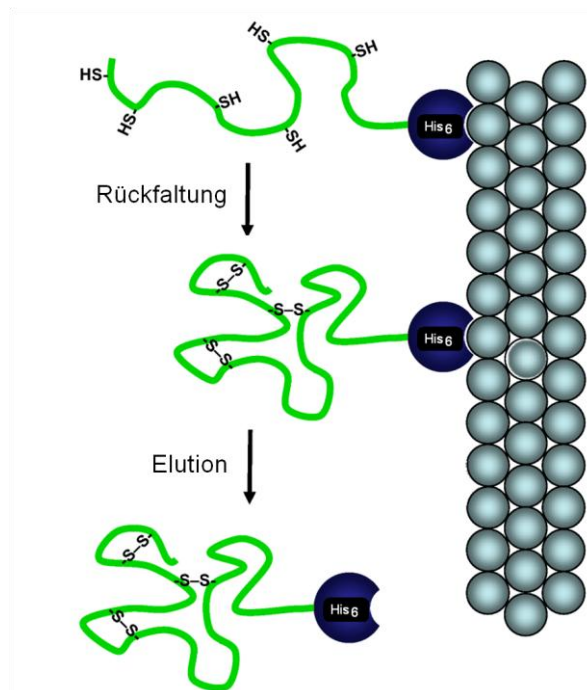


Abbildung 4.5. Schematische Darstellung der Renaturierung der TMPRSS2 unter Verwendung eines chromatographischen Verfahrens. Nach Bindung des His-Tags der denaturierten Protease an der Säulenmatrix wurde über einen Gradienten zu einem nativen Puffer gewechselt und somit die Renaturierung durchgeführt. Nach Bildung der Disulfidbrücken wurde das Protein eluiert.

Vor Elution der renaturierten Protease wurde zunächst mit Elutionspuffer I das oxidierte Glutathion entfernt und mit Elutionspuffer II noch mögliche vorhandene Verunreinigungen, die unspezifisch am Säulenmaterial binden, abgetrennt. Anschließend wurde die TMPRSS2 mit Elutionspuffer III eluiert. Im Rahmen dieser Arbeit ist es jedoch nicht gelungen, mit diesem Protokoll die Rückfaltung der TMPRSS2 erfolgreich zu etablieren, da die spätere Umsetzung des eluierten Proteins

mit DAPase (s. Abschnitt 4.2.4) nur zu inaktivem Protein geführt hat. Möglicherweise müssen die Pufferzusammensetzung und der pH-Wert optimiert werden, da auch bei dieser Variante der Renaturierung für jedes Protein optimale Bedingungen experimentell ermittelt werden müssen [93-95].

4.2.4 Aktivierung der TMPRSS2 mit der Dipeptidylpeptidase DAPase

Das aus der Rückfaltung unter Verwendung der *rapid dilution* Methode erhaltene Protein wurde zunächst unter Verwendung von PD-10 Säulen (GE Healthcare) nach einem Standardprotokoll in Aktivierungspuffer überführt. Die Aktivierung erfolgte durch Inkubation mit DAPase, einer speziellen Dipeptidylpeptidase, die ein modifiziertes Cathepsin C ist [96]. Bei dieser Methode wird schrittweise die N-terminale Sequenz Met-Lys-(His)₆ als Dipeptide abgespalten. Dadurch erhält man ein Protein mit einem N-terminalen Isoleucinrest an Position 16 (Ile16) der katalytischen Domäne, der für die enzymatische Aktivität der TMPRSS2 essentiell ist. Die zeitabhängige Aktivierung mit DAPase wurde durch die Spaltung des chromogenen Substrates CH₃-SO₂-D-Cha-Gly-Arg-pNA verfolgt. Ab einer Stunde nach Beginn der Aktivierung wurden alle 30 Minuten Proben der Inkubationslösung analysiert. Nach insgesamt fünf Stunden konnte keine weitere Zunahme der Aktivität bestimmt werden (Abbildung 4.6).

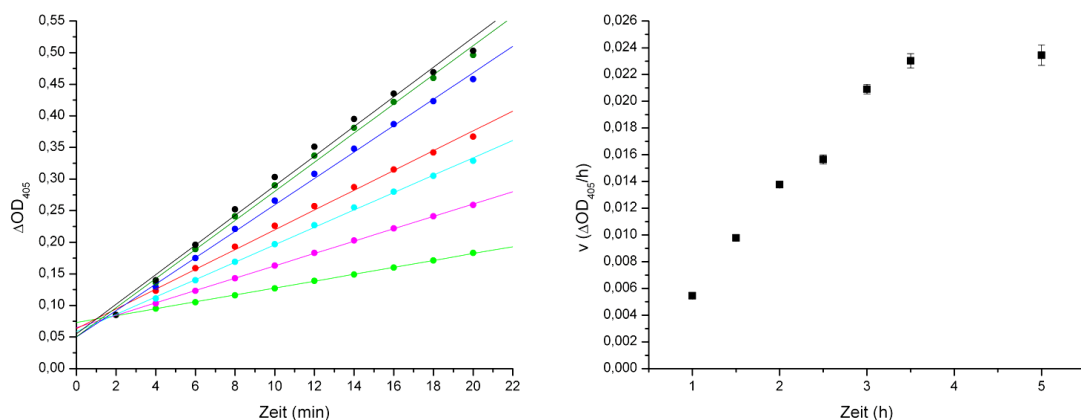


Abbildung 4.6. Graphen der zeitabhängigen Aktivierung der TMPRSS2. Links: Zeit-Umsatzkurve; die Proben wurden nach 1 (hellgrün), 1,5 (pink), 2 (hellblau), 2,5 (rot), 3 (dunkelblau), 3,5 (dunkelgrün) und 5 (schwarz) Stunden dem Aktivierungsansatz entnommen und die Geschwindigkeit der Spaltung des Substrates CH₃-SO₂-D-Cha-Gly-Arg-pNA bestimmt. Rechts: Auftragung der Geschwindigkeiten in Abhängigkeit der Zeit.

Schließlich wurde die DAPase, die mit einem His-Tag modifiziert ist, durch Affinitätschromatographie mit einer Ni-NTA-Säule aus dem Aktivierungsansatz entfernt. Auf Grund der sehr begrenzten Menge an aktiver TMPRSS2 war es nicht möglich, eine weitere Reinigung mittels Größenausschlusschromatographie durchzuführen. Diese Präparation der TMPRSS2 wurde im Rahmen dieser Arbeit für alle folgenden enzymkinetischen Messungen und die Bestimmung der Hemmkonstanten verwendet.

4.2.5 SDS-PAGE und Western Blot

Die aktivierte katalytische Domäne der TMPRSS2 wurde mit Hilfe einer SDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung oder einem Western Blot unter Verwendung von spezifischen Antikörpern gegen die katalytische Domäne der TMPRSS2 analysiert. Die verwandte Protease Matriptase wurde als Kontrolle verwendet (Abbildung 4.7). Die erhaltene Menge an aktiver TMPRSS2 reichte jedoch nicht aus, um sie mittels Coomassiefärbung sichtbar zu machen (Abbildung 4.7a). Für die Kontrolle mit Matriptase wurde eine etwa zehnfach höhere Konzentration an gereinigtem Protein verwendet, die durch Coomassie anfärbbar war. Die aktivierte TMPRSS2 konnte als Einzelbande mit einem Molekulargewicht von etwa 28 kDa durch einen Immun Blot detektiert werden (Abbildung 4.7b), wobei das verwendete Kontrollprotein Matriptase, wie zu erwarten, nicht durch TMPRSS2-spezifische Antikörper nachweisbar war.

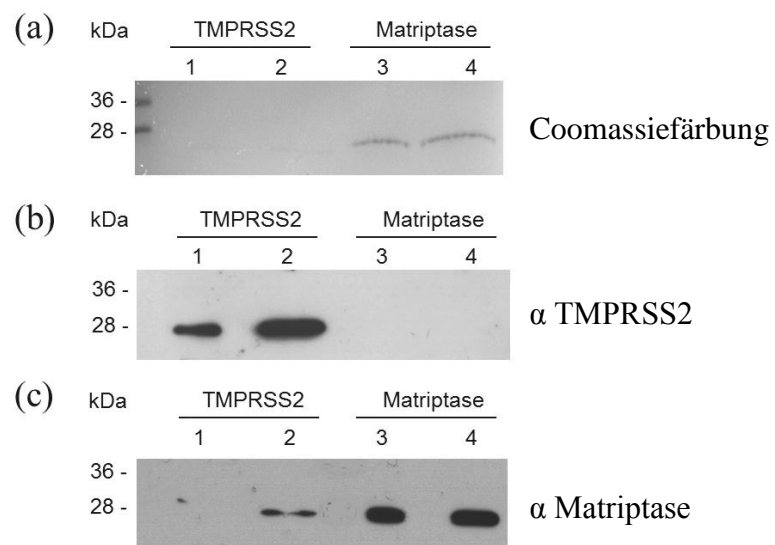


Abbildung 4.7. Charakterisierung der aktiven TMPRSS2-Präparation und der Matriptase, die als Kontrolle verwendet wurde. (a) SDS-PAGE und anschließende Coomassiefärbung (TMPRSS2: 0,06 mg/mL, 10 µL in Spur 1 und 20 µL in Spur 2; Matriptase: 0,5 mg/mL, 10 µL in Spur 3 und 20 µL in Spur 4). (b) SDS-PAGE und anschließender Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen TMPRSS2 (TMPRSS2: 0,06 mg/mL, 5 µL in Spur 1 und 10 µL in Spur 2, Matriptase: 0,05 mg/mL, 5 µL in Spur 3 und 10 µL in Spur 4). (c) SDS-PAGE und anschließender Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen Matriptase (TMPRSS2: 0,06 mg/mL, 5 µL in Spur 1 und 10 µL in Spur 2; Matriptase: 0,05 mg/mL, 5 µL in Spur 3 und 10 µL in Spur 4).

Zusätzlich wurde ein Western Blot durchgeführt, bei dem spezifische Antikörper gegen die katalytische Domäne der Matriptase verwendet wurden. Dieser kommerziell erhältliche Antikörper ist allerdings nicht nur spezifisch gegen Matriptase gerichtet, sondern kann auch in ganz geringen Mengen TMPRSS2 detektieren (Abbildung 4.7c). Bei beiden Immun Blots wurden die gleichen Konzentrationen der Proteasen verwendet, sodass eindeutig zu erkennen ist, dass die Affinität des Matriptase-Antikörpers gegen TMPRSS2 viel geringer ist und die Detektion ein unspezifischer Nebeneffekt ist.

4.3 Heterologe Produktion, Reinigung, Rückfaltung und Aktivierung der rekombinanten Matriptase

4.3.1 Expression der Matriptase

Die Klonierung des Expressionsplasmid pET24(b)-Matriptase der katalytische Domäne der Matriptase wurde bereits in früheren Arbeiten beschrieben [90].

Für die Transformation des Plasmids wurde ein *E.coli*-Expressionstamm BL21Gold(DE3) verwendet. Die Expression der Matriptase, die wie die zuvor beschriebene TMPRSS2 N-terminal die Sequenz Met-Lys-(His)₆ besitzt, erfolgte bei 37 °C für 3 Stunden, wobei die Bakterienkultur vor der Induktion für 2,5 Stunden bei 37 °C inkubiert wurde. Nach Zellaufschluss mittels Ultraschall wurden die *inclusion bodies* in Lysepuffer I für zwei Stunden inkubiert. Die nicht löslichen Bestandteile wurden abzentrifugiert und das denaturierte, lösliche Protein mittels Affinitätschromatographie über eine Ni-NTA-Säule gereinigt. Auf Grund des erhaltenen Volumens war es erforderlich, die Matriptase in mehreren Schritten auf die Ni-NTA-Säule aufzutragen (Abbildung 4.8). Nach Beendigung der Auftragung wurde die Säule mit Lysepuffer II bei pH 6,3 gewaschen, wobei unspezifisch gebundenes Protein entfernt wurde (Peak bei 38 Minuten). Anschließend wurde die Matriptase mit Lysepuffer III bei pH 4,5 eluiert (peak bei 55 Minuten).

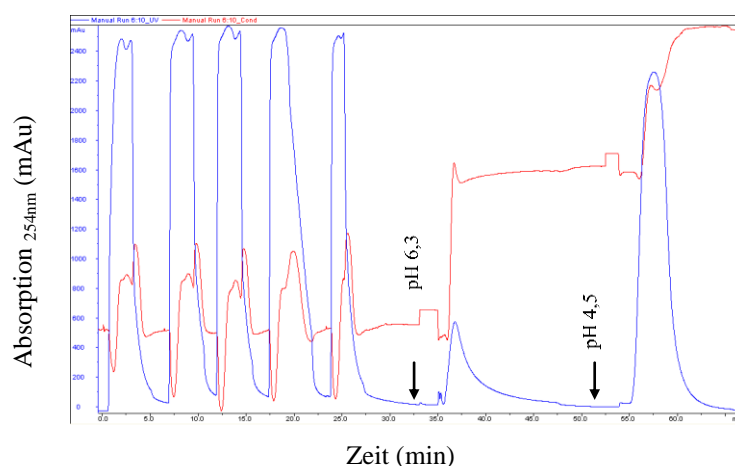


Abbildung 4.8. Affinitätschromatographie zur Reinigung der Matriptase mit einer Ni-NTA Säule. Die Elution des Zielproteins erfolgte nach 55 Minuten bei pH 4,5. Blau: UV-Absorption bei 254 nm; rot: Leitfähigkeit des Eluats. Initial wurden unspezifisch gebundene Proteine mit Lysepuffer II bei pH 6,3 von der Säule gewaschen, danach wurde die Matriptase mit Lysepuffer III bei pH 4,5 eluiert.

4.3.2 Rückfaltung der Matriptase

Die Matriptase wurde gemäß früher beschriebenen Methoden [90] rückgefaltet. Hierfür wurde die mittels Affinitätschromatographie gereinigte Protease in das 50-fache Volumen des Renaturierungspuffers I unter ständigem Rühren getropft und für drei Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Renaturierungspuffer I über eine Tangentialmembran (cut-off 10 kDa, Satorius) aufkonzentriert.

Da die Rückfaltung der Matriptase unter den in der Literatur beschriebenen Bedingungen nicht reproduziert werden konnte, wurde eine Optimierung des Renaturierungspuffers versucht. Hierfür wurden die Tris-, CaCl_2 - und EDTA-Konzentration konstant gehalten und jeweils eine Konzentration der verbleibenden Komponenten variiert (Tabelle 4.3).

Tabelle 4.3. Variationen der L-Arginin-, NaCl- und Brij 58-Konzentration im Rückfaltungspuffer (konstante Bestandteile: 50 mM Tris, pH 7,5, 20 mM CaCl_2 , 1 mM EDTA).

L-Arginin HCl	NaCl	Brij 58
0,5 M	100 mM	0,05 %
0,5 M	250 mM	0,05 %
1,0 M	100 mM	0,05 %
1,0 M	250 mM	0,05 %
0,5 M	100 mM	0,10 %

Im Rahmen dieser Arbeit war es allerdings nicht möglich die Bedingungen für die Rückfaltung der Matriptase weiter zu optimieren und die Menge an aktiver Matriptase zu steigern. Daher wurde für weitergehende Präparationen wieder das Standardprotokoll aus der Literatur mit 0,5 M L-Arginin, 20 mM CaCl_2 , 1 mM EDTA und 100 mM NaCl bei pH 7,5 verwendet.

4.3.3 Aktivierung der Matriptase mit DAPase

Das aus der Rückfaltung erhaltene Protein wurde zunächst unter Verwendung von PD-10 Säulen (GE Healthcare) nach einem Standardprotokoll in Aktivierungspuffer überführt. Anschließend wurde durch Inkubation mit DAPase schrittweise die N-terminale Sequenz Met-Lys-(His)₆ abgespalten. Dadurch wurde die enzymatisch aktive Protease mit einem N-terminalen Valin an Position 16 (Val16) der katalytischen Domäne erhalten. Die zeitabhängige Aktivierung wurde durch die Spaltung des chromogenen Substrates CH₃-SO₂-D-Cha-Gly-Arg-pNA überprüft. Nach verschiedenen Zeiten wurden aus der Inkubationslösung Proben entnommen und analysiert. Auf Grund der Erfahrungen mit TMPRSS2 wurde die erste Probe der Inkubationslösung erst nach 6 Stunden vermessen. Nach insgesamt 7 Stunden konnte kein weiterer Anstieg der Aktivität festgestellt werden (Abbildung 4.9).

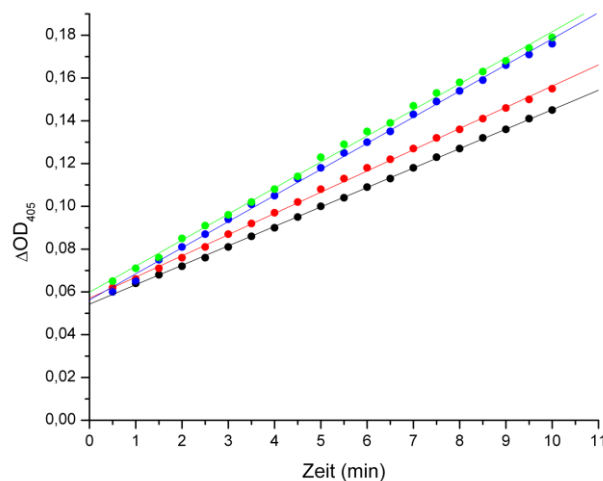


Abbildung 4.9. Zeit-Umsatzkurven der N-terminalen Aktivierung der Matriptase. Die Proben wurden nach 6 (schwarz), 6,5 (rot), 7 (blau) und 7,5 (grün) Stunden dem Aktivierungsansatz entnommen und die Geschwindigkeit der Spaltung des Substrats CH₃-SO₂-D-Cha-Gly-Arg-pNA bestimmt.

Anschließend wurde die mit einem His-Tag modifizierte DAPase durch Affinitätschromatographie aus dem Aktivierungsansatz entfernt. Danach wurde die Matriptase-Präparation noch über eine Größenausschlusschromatographie mit einer Superdex 75 Säule (GE Healthcare) gereinigt (Abbildung 4.10).

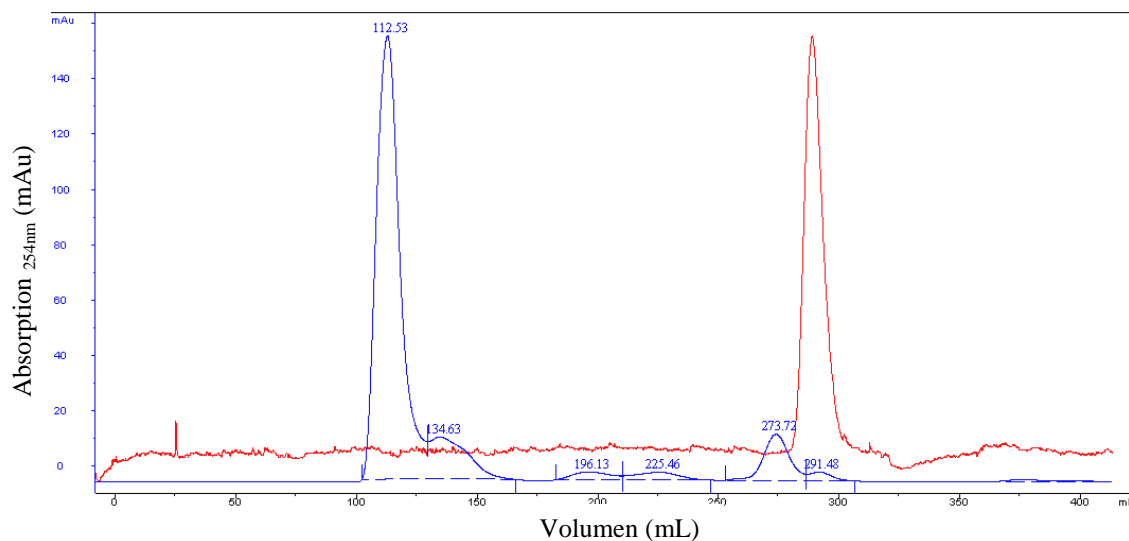


Abbildung 4.10. Chromatogramm der finalen Größenausschlusschromatographie in Aktivierungspuffer zur Reinigung der Matriptase mittels einer HiLoad 26/60 Superdex 75 prep grade Säule. Blau: UV-Absorption bei 254 nm; rot: Leitfähigkeit des Eluats. Die aktive Matriptase eluiert im Bereich von 255 bis 291 mL.

Durch Inkubation der einzelnen Fraktionen mit dem chromogenen Substrat $\text{CH}_3\text{-SO}_2\text{-D-Cha-Gly-Arg-pNA}$ konnte unter dem Peak bei ca. 274 mL die aktive Matriptase identifiziert werden, der nur etwa 5 % der gesamten Proteinmenge entspricht. Das initial eluierte Protein nach ca. 112 mL zeigte keine enzymatische Aktivität. Da das Ausschlussvolumen der verwendeten Säule ca. 100 mL beträgt und das eingesetzte Säulenmaterial einen cut-off 75 kDa besitzt, ist davon auszugehen, dass das eluierte Protein bei 112 mL eine Masse von ungefähr 70 kDa hat. Die Masse der katalytischen Domäne der Matriptase beträgt etwa 26 kDa. Das lässt vermuten, dass der größte Teil des Proteins nicht als Monomer, sondern in aggregierter Form vorliegt, die jedoch nicht näher bestimmt wurde. Jedoch zeigte die Analyse mittels einer SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen nur eine Bande bei 26 kDa (Abbildung 4.11), sodass es sich sehr wahrscheinlich um inaktive Aggregate der Matriptase und nicht um Verunreinigungen handelt.

Aus 2 L Kultur konnten schließlich ca. 2 mg der aktive Matriptase hergestellt werden.

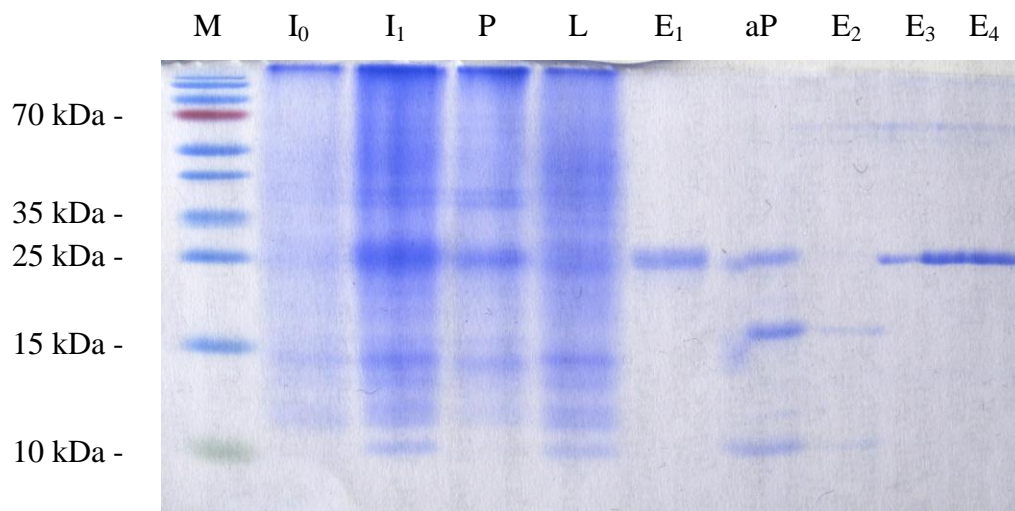


Abbildung 4.11. SDS-PAGE und Coomassiefärbung der Expression und Reinigung der rekombinanten Matriptase: Marker (M), Gesamtzelllysats vor Induktion (I_0), Gesamtzelllysats 3 h nach Induktion (I_1), unlösliche Fraktion des Zelllysats (P), lösliche Fraktion der Zelllysats (L), Eluat von der Ni-NTA-Säule mit Lysepuffer III bei pH 4,5 (E_1), aktive Matriptase als Kontrolle (aP), Eluat von der Superdex 75 Säule bei 196 und 225 mL (E_2), Eluat von der Superdex 75 Säule bei 112 mL (E_3), Eluat von Superdex 75 Säule bei 273 mL (E_4). Das aus der Aminosäuresequenz berechnete Molekulargewicht beträgt 26 kDa, eine Bande ist deutlich bei der entsprechenden Laufhöhe sichtbar. (Da das bei 112 mL eluierte Protein sehr wahrscheinlich Aggregate der Matriptase (E_3) sind, wird dessen Bande beim identischen Molekulargewicht wie die Monomere aktive Matriptase (E_4) detektiert.)

4.4 Heterologe Produktion, Reinigung, Rückfaltung und Aktivierung der rekombinanten HAT

4.4.1 Expression der HAT

Die katalytische Domäne der trypsinartigen Serinprotease HAT wurde, wie oben beschrieben, kloniert und in den *E.coli*-Expressionstamm BL21 CodonPlus(DE3)-RILP transformiert. Die Expression der HAT mit der N-terminalen Sequenz Met-Lys-(His)₆ erfolgte bei 37 °C für 3 Stunden, wobei die Bakterienkultur vor der Induktion für 2,5 Stunden bei 37 °C inkubiert wurde. Nach Zellaufschluss mittels Ultraschall wurden die *inclusion bodies* in Denaturierungspuffer I für zwei Stunden inkubiert. Die nicht löslichen Bestandteile wurden abzentrifugiert und das denaturierte, lösliche Protein mittels Affinitätschromatographie nach mehrmaligen Auftragungen über eine Ni-NTA-Säule gereinigt (Abbildung 4.12). Hierfür wurde die Säule zunächst mit Lysepuffer II bei pH 6,3 gewaschen, um unspezifisch gebundenes Protein zu entfernen, wobei bei dieser Reinigung kein Protein unspezifisch an die Säule gebunden hat. Die Protease wurde mit Lysepuffer III bei pH 4,5 eluiert.

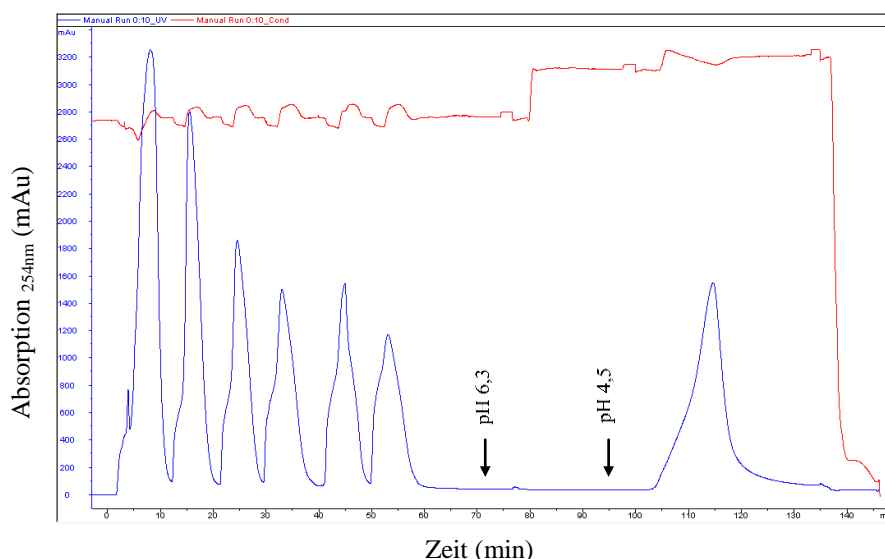


Abbildung 4.12. Chromatogramm der Affinitätschromatographie zur Reinigung der HAT mittels einer Ni-NTA Säule. Blau: UV-Absorption bei 254 nm; rot: Leitfähigkeit des Eluats. Die Elution der HAT erfolgte nach 100 min mit Lysepuffer III bei pH 4,5.

Die Präparation der HAT wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung analysiert (Abbildung 4.13).

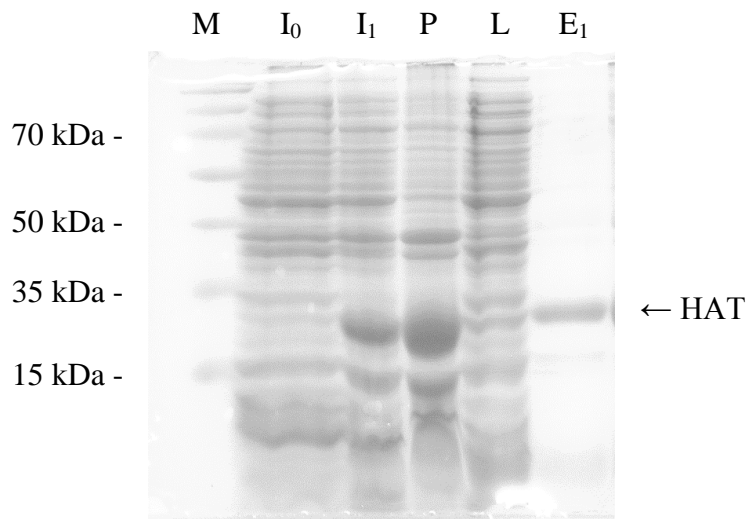


Abbildung 4.13. SDS-PAGE und Coomassiefärbung der Expression und Reinigung der rekombinanten HAT: Marker (M), Gesamtzelllysats vor Induktion (I₀), Gesamtzelllysats 3 h nach Induktion (I₁), unlösliche Fraktion des Zelllysats (P), lösliche Fraktion der Zelllysats (L) und Eluat der Ni-NTA-Säule mit Lysepuffer III bei pH 4,5 (E₁). Das aus der Aminosäuresequenz berechnete Molekulargewicht beträgt 25 kDa, eine Bande ist deutlich bei der entsprechenden Laufhöhe sichtbar.

Aus zwei Litern Medium wurden 40 mg der noch inaktiven HAT nach der Affinitätschromatographie erhalten.

4.4.2 Rückfaltung der HAT

Es wurde versucht, die Renaturierung der HAT mit Hilfe der *rapid dilution* Methode durchzuführen [90]. Hierfür wurde das über die Affinitätschromatographie gereinigte Protein in das 50-fache Volumen des Renaturierungspuffers I unter ständigem Rühren getropft. Der Renaturierungsansatz wurde für drei Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Rückfaltungspuffer mittels einer Tangentialmembran (cut-off 10 kDa, Satorius) aufkonzentriert. Zunächst wurde versucht, die bereits für die verwandte Matriptase in der Literatur beschriebenen Bedingungen [90] auf die Rückfaltung der HAT anzuwenden, jedoch konnte keine aktive HAT erhalten werden.

Auch bei dieser Protease wurde versucht, die Zusammensetzung des Renaturierungspuffers zu optimieren. Hierfür wurden die Tris-, CaCl₂- und EDTA-

Konzentration konstant gehalten und jeweils eine Konzentration der verbleibenden Komponenten variiert (Tabelle 4.4).

Tabelle 4.4. Variationen der L-Arginin-, NaCl- und Brij 58-Konzentration im Rückfaltungspuffer (konstante Bestandteile: 50 mM Tris, pH 7,5, 20 mM CaCl₂, 1 mM EDTA).

L-Arginin HCl	NaCl	Brij 58
0,5 M	100 mM	0,05 %
0,5 M	250 mM	0,05 %
0,5 M	500 mM	0,05 %
0,5 M	1,0 M	0,05 %
1,0 M	100 mM	0,05 %
1,0 M	250 mM	0,05 %
0,5 M	100 mM	0,10 %
0,5 M	250 mM	0,10 %

Während der Rückfaltung der HAT traten zwei verschiedene Probleme auf. Entweder ist die Protease schon im Rückfaltungspuffer oder während des anschließenden Umpufferens nahezu quantitativ ausgefallen, oder wenn lösliches renaturiertes Protein erhalten wurde, konnte nach Umsetzung mit DAPase kein aktives Protein erhalten werden. Daher war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, die Bedingungen für eine erfolgreiche Rückfaltung der HAT zu etablieren.

Da kurze Zeit nach Beginn der Arbeiten zur Herstellung der HAT das Enzym kommerziell von der Firma R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland) erhältlich war, wurden keine weiteren Versuche zur Herstellung der HAT unternommen.

4.5 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Qualität eines Substrates wird normalerweise durch den Term k_{cat}/K_m beschrieben, wobei die Berechnung des k_{cat} -Wertes die genaue Kenntnis der verwendeten aktiven Proteinkonzentration voraussetzt. Die Titration der aktiven Zentren (*active-site* Titration) ist für trypsinartige Proteasen mit dem Substrat 4-Methylumbelliferyl *p*-guanidinobenzoat (MUGB) möglich (Abbildung 4.14). Dabei kommt es bei Inkubation mit einer ausreichenden Enzymmenge zu einer sprunghaften Bildung (engl. *burst*) des Produkts 4-Methylumbelliferon, das mittels Fluoreszenzdetektion bestimmbar ist [97-99].

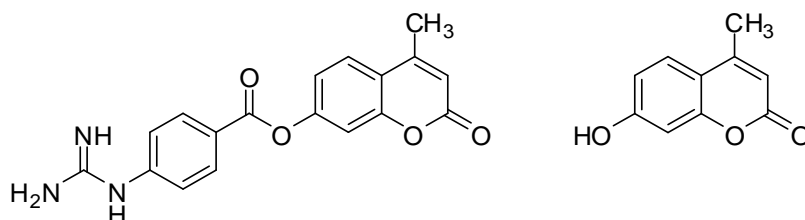


Abbildung 4.14. Strukturen des Substrats 4-Methylumbelliferyl *p*-guanidinobenzoat (MUGB) (links) und des bei der *active-site* Titration entstehenden Produkts 4-Methylumbelliferon (rechts).

Initial muss eine Kalibriergerade mit dem Produkt 4-Methylumbelliferon unter identischen Messbedingungen aufgenommen werden (Abbildung 4.15 links). Dazu wurden die Konzentration des 4-Methylumbelliferons mittels Zugabe von Messpuffer über zwei Größenordnungen variiert, wobei vier unabhängige Einwaagen bei jeder Konzentration zweimal unabhängig vermessen wurden.

Zur Etablierung des Systems wurde am Anfang eine Messung mit Thrombin durchgeführt. Hierfür wurde zur Bestimmung der Konzentration neben der enzymatischen Spaltung des Substrats die nichtenzymatische Hydrolyse der Esterbindung des Substrats MUGB bestimmt und von den Messwerten der enzymatischen Spaltung subtrahiert. Anschließend wurde die Geradengleichung des linearen Teils der Zeit-Umsatzkurven berechnet und bis zur y-Achse extrapoliert (Abbildung 4.15 rechts).

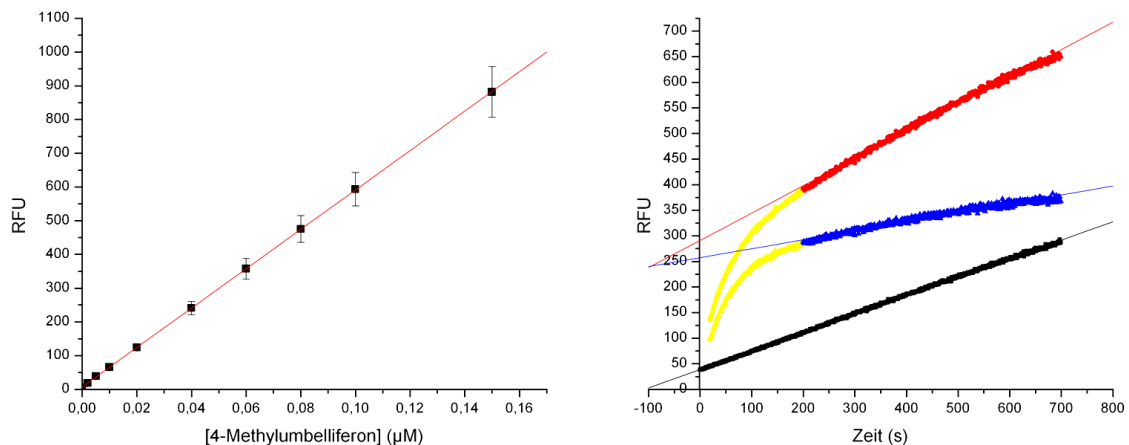


Abbildung 4.15. Kalibriergerade für Methylumbelliferon (links) und Kurven der *active-site* Titration mit dem Substrat MUGB für die Proteinkonzentrationsbestimmung des Thrombins (rechts). Schwarz: nichtenzymatische Hydrolyse; rot: Messung mit Thrombin; blau: Korrektur der Thrombinkurve mit der nichtenzymatischen Hydrolyse. Für dieses Experiment wurde ein initialer Burst auf ca. 252 RFU bestimmt, der einer aktiven Enzymkonzentration von 40 nM im Ansatz entspricht.

Mit Hilfe des errechneten Fluoreszenzsignals (RFU) zum Zeitpunkt $t = 0$ s kann die aktive Thrombinkonzentration aus der zuvor bestimmten Kalibriergeraden des 4-Methylumbelliferons ermittelt werden, die in diesem Ansatz 40 nM beträgt. Bei einer weiteren Verdünnung des Thrombins waren keine reproduzierbaren Messungen möglich.

Anschließend wurde versucht, eine *active-site* Titration mit der hergestellten TMPRSS2-Präparation durchzuführen. Jedoch war es auch mit der unverdünnten Stammlösung nicht möglich, einen ausreichenden Burst zu erhalten. Demzufolge war keine *active-site* Titration der TMPRSS2 möglich. Aus den Messungen mit Thrombin lässt sich allerdings folgern, dass die TMPRSS2 Konzentration der verwendeten Stammlösung deutlich unterhalb einer Konzentration von 40 nM liegt.

So konnte im weiteren Verlauf dieser Arbeit zur Untersuchung und Quantifizierung von Substraten der TMPRSS2 lediglich der Term V_{\max}/K_m in der Einheit $1/s$ berechnet werden. Dieser Ausdruck ist allerdings proportional zum Term k_{cat}/K_m . Somit ist es möglich, die Umsatzgeschwindigkeiten einer Serie von Substraten unter identischen Bedingungen vergleichend zu bestimmen.

4.6 Screening der *p*NA-Substrate mit TMPRSS2

In der Literatur sind nur wenige Daten verfügbar, die die Substratspezifität der TMPRSS2 beschreiben. Es wurde berichtet, dass das fluorogene Trypsinsubstrat Cbz-Gly-Gly-Arg-AMC [60] und Boc-Leu-Gly-Arg-AMC [35] durch TMPRSS2 gespalten werden, jedoch wurden für diese Substrate keine enzymkinetischen Parameter wie, K_m - und V_{max} -Werte, ermittelt. So wurden zu Beginn dieser Arbeit zunächst 16 verschiedene chromogene *p*NA-Substrate verschiedener trypsinartiger Serinproteasen (Tabelle A.1) in einem initialen Screen untersucht. Bei einer festgelegten Substratkonzentration von 200 μ M im Ansatz wurden die jeweiligen Spaltraten der verschiedenen Substrate bestimmt, wobei die höchste Spaltrate des Substrates H-D-Cha-Gly-Arg-*p*NA (**1**) als 100 % festgesetzt wurde (Tabelle 4.5).

Aus diesen anfänglichen Daten lässt sich schlussfolgern, dass Glycin in P2-Position und hydrophobe D-konfigurierte Aminosäuren in P3-Position bevorzugt akzeptiert werden. Die Substrate **1** und **2** besitzen identische Maximalgeschwindigkeiten und nur marginale Unterschiede in ihren K_m -Werten. Beide Substrate haben N-terminal eine ungeschützte Aminosäure in P3-Position, wobei allerdings eine Methylsulfonyl- oder Methoxycarbonylgruppe als P4-Reste ebenfalls toleriert werden (Substrate **3** und **4**).

Basierend auf diesen anfänglichen Untersuchungen wurden v/S -Charakteristiken der fünf besten chromogenen Substrate bestimmt, die erhaltenen K_m - und V_{max} -Werte sind in Tabelle 4.5 zusammengefasst. Die Substrate **3** und **5** wurden am effektivsten gespalten, wobei beide eine Methylsulfonylgruppe in P4- und Glycin in P2-Position besitzen.

Tabelle 4.5. Spaltraten und enzymkinetische Parameter für die Umsetzung chromogener *p*NA-Substrate durch TMPRSS2.

Nr.	Substrat	Spaltrate (%)	V_{\max} ($M \cdot s^{-1}$)	K_m (μM)	V_{\max}/K_m (s^{-1})
1	H-D-Cha-Gly-Arg- <i>p</i> NA	100	$2,16 \cdot 10^{-8}$	59	$3,67 \cdot 10^{-4}$
2	H-D-Hht-Gly-Arg- <i>p</i> NA	87	$2,16 \cdot 10^{-8}$	65	$3,33 \cdot 10^{-4}$
3	CH ₃ -SO ₂ -D-Chg-Gly-Arg- <i>p</i> NA	70	$1,35 \cdot 10^{-8}$	26	$5,18 \cdot 10^{-4}$
4	CH ₃ -O-CO-D-Cha-Gly-Arg- <i>p</i> NA	58	$1,22 \cdot 10^{-8}$	55	$2,20 \cdot 10^{-4}$
5	CH ₃ -SO ₂ -D-Cha-Gly-Arg- <i>p</i> NA	54	$0,95 \cdot 10^{-8}$	19	$5,03 \cdot 10^{-4}$
6	CH ₃ -SO ₂ -D-Phe-Gly-Arg- <i>p</i> NA	50	n.d.	n.d.	n.d.
7	H-D-Lys(Cbz)-Pro-Arg- <i>p</i> NA	42	n.d.	n.d.	n.d.
8	H-D-Chg-Ala-Arg- <i>p</i> NA	33	n.d.	n.d.	n.d.
9	H-D-Pro-Phe-Arg- <i>p</i> NA	32	n.d.	n.d.	n.d.
10	Tos-Gly-Pro-Arg- <i>p</i> NA	29	n.d.	n.d.	n.d.
11	H-D-Val-Ser-Arg- <i>p</i> NA	28	n.d.	n.d.	n.d.
12	H-Glu-Gly-Arg- <i>p</i> NA	26	n.d.	n.d.	n.d.
13	Tos-Gly-Pro-Lys- <i>p</i> NA	25	n.d.	n.d.	n.d.
14	Benzoyl-β-Ala-Gly-Arg- <i>p</i> NA	21	n.d.	n.d.	n.d.
15	H-D-Val-Cha-Arg- <i>p</i> NA	5.9	n.d.	n.d.	n.d.
16	Benzoyl-Pro-Phe-Arg- <i>p</i> NA	4.5	n.d.	n.d.	n.d.

4.7 Screening der AMC-Substrate mit TMPRSS2

Auf Grund der begrenzten Menge an verfügbarer aktiver TMPRSS2 wurden neben den chromogenen auch vergleichbare Fluoreszenzsubstrate geprüft, da diese zuverlässige Messungen mit deutlich geringeren Enzymmengen ermöglichen.

Da aus der Literatur kaum Daten zu enzymkinetischen Untersuchungen mit TMPRSS2 bekannt waren, musste ein neues Testsystem zur Bestimmung der enzymkinetischen Parameter und der Hemmkonstanten für Inhibitoren etabliert werden.

Zunächst wurde untersucht, mit welchen Pufferbedingungen eine adäquate Aktivität der TMPRSS2 während der Messungen erreicht wird. So wurde für das Substrat H-D-Cha-Pro-Arg-AMC, von dem bekannt ist, dass es von der verwandten trypsinartigen Serinprotease HAT effektiv umgesetzt wird [84], jeweils eine v/S-Charakteristik in drei verschiedenen Messpuffern bestimmt. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist in Tabelle 4.6 dargestellt.

Tabelle 4.6. Zusammensetzung der Messpuffer.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Standard-Puffer [88, 100]	50 mM Tris pH 8,0, 154 mM NaCl
TMPRSS2-Puffer	50 mM Tris pH 7,5, 1 M NaCl, 0,05 % Brij 58
HAT-Puffer [84]	50 mM Tris pH 9,5, 0,05 % Brij 58, 0,1 mg/mL BSA

Die aus der Proteinexpression erhaltene aktive TMPRSS2 wurde zu 10 µL aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Für die Messung wurde das Enzym 1:200 in TMPRSS2-Puffer verdünnt und 20 µL dieser Verdünnung im Messansatz mit einem Gesamtvolumen von 200 µL eingesetzt. Abbildung 4.16 zeigt die v/S-Charakteristiken, aus denen die in Tabelle 4.7 gezeigten enzymkinetischen Parameter berechnet wurden.

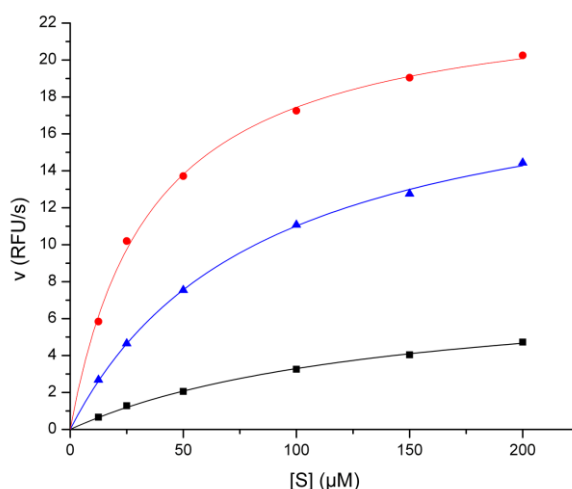


Abbildung 4.16. Graphen der Michaelis-Menten-Auftragungen für das Substrat H-D-Cha-Pro-Arg-AMC (17) unter Verwendung verschiedener Messpuffer. Rot: Standard-Puffer, blau: HAT-Puffer, schwarz: TMRSS2-Puffer.

Die effektivste Spaltung dieses Substrats wurde unter Verwendung des Standard-Puffers bestimmt, dagegen führte der TMRSS2-Puffer zu den geringsten V_{\max}/K_m -Werten (Tabelle 4.7). Daher und zur Vereinheitlichung der Messbedingungen [88, 100] in unserem Arbeitskreis wurde der Standard-Puffer für alle weiteren enzymkinetischen Messungen verwendet.

Tabelle 4.7. Enzymkinetische Parameter für das Substrat H-D-Cha-Pro-Arg-AMC (17) unter Verwendung verschiedener Messpuffer.

Puffer	V_{\max} ($\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$)	K_m (μM)	V_{\max}/K_m (s^{-1})
Standard-Puffer	$1,43 \cdot 10^{-10}$	43	$3,31 \cdot 10^{-6}$
HAT-Puffer	$1,51 \cdot 10^{-10}$	84	$1,79 \cdot 10^{-6}$
TMRSS2-Puffer	$0,59 \cdot 10^{-10}$	142	$0,42 \cdot 10^{-6}$

Diese initialen Messungen zeigten, dass für die Verdünnung des Enzyms unbedingt der TMRSS2-Puffer erforderlich ist, da sonst keine linearen Zeit-Umsatzkurven erhalten wurden (Abbildung 4.17). Das nicht-ionische Detergens auf Polyethylenglykolbasis Brij 58, das im TMRSS2-Puffer enthalten ist, dient der Stabilität der Protease, was auch schon für die verwandte Serinprotease HAT gezeigt werden konnte [101].

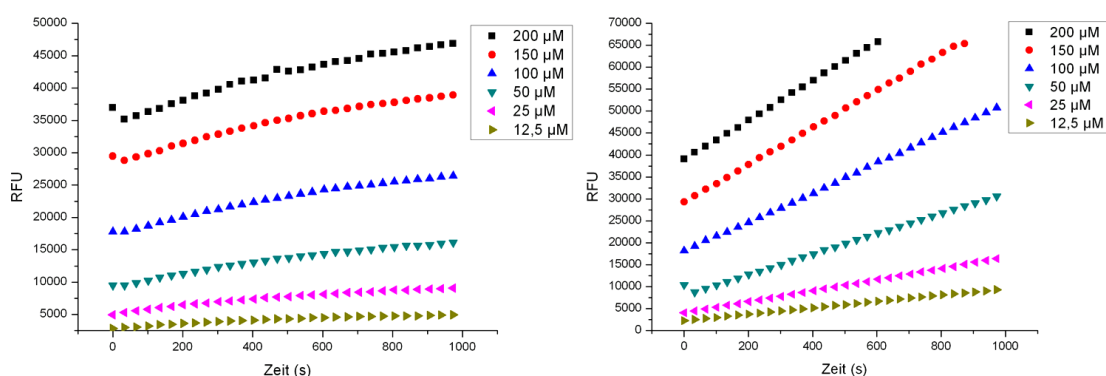


Abbildung 4.17. Zeit-Umsatzkurven für das Substrat H-D-Cha-Pro-Arg-AMC (**17**) bei der die 1:200 Verdünnung des Enzyms in Standard- (links) oder TMRSS2-Puffer (rechts) erfolgte. Für die eigentlichen Messungen wurde der Standard-Puffer verwendet.

Zur Auswahl eines geeigneten AMC-Substrates wurden die enzymkinetischen Parameter V_{\max} und K_m von sieben verschiedenen Verbindungen ermittelt. Zur Bestimmung der Produktbildung wurde das Fluoreszenzsignal (RFU) durch den Proportionalitätsfaktor 134776 dividiert, der mit Hilfe einer AMC-Kalibriergerade unter identischen Messbedingungen am gleichen Messgerät erhalten wurde (s. Abbildung A.2). In Abbildung 4.18 sind die Graphen für die Bestimmung der enzymkinetischen Parameter (Tabelle 4.8) dargestellt.

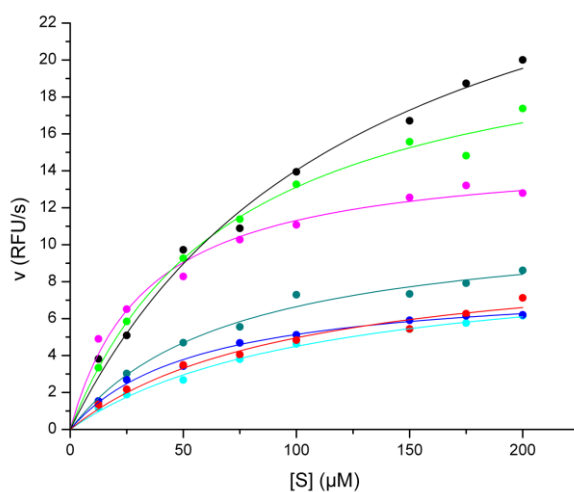


Abbildung 4.18. Michaelis-Menten-Auftragungen für die Substrate **17** (magenta), **18** (hellgrün), **19** (schwarz), **20** (türkis), **21** (dunkelblau), **22** (rot) und **23** (hellblau).

Der größte V_{\max}/K_m -Wert wurde für das Substrat H-D-Cha-Pro-Arg-AMC (**17**) bestimmt, das deshalb für die weiteren Messungen standardmäßig verwendet wurde.

Tabelle 4.8. Enzymkinetische Parameter der untersuchten tripeptidischen AMC-Substrate. Zur Berechnung des V_{\max} -Werts wurde der Proportionalitätsfaktor 134776 verwendet, der anhand einer AMC-Kalibriergeraden ermittelt wurde.

Nr.*	Sequenz	Spaltrate (%)	V_{\max} ($M \cdot s^{-1}$)	K_m (μM)	V_{\max}/K_m (s^{-1})
17	H-D-Cha-Pro-Arg-AMC	54,5	$1,43 \cdot 10^{-10}$	43	$3,31 \cdot 10^{-6}$
18	Tos-Gly-Pro-Arg-AMC	67,3	$1,77 \cdot 10^{-10}$	81	$2,19 \cdot 10^{-6}$
19	Tos-Gly-Pro-Lys-AMC	100	$2,63 \cdot 10^{-10}$	159	$1,65 \cdot 10^{-6}$
20	Boc-Leu-Gly-Arg-AMC	32,9	$0,86 \cdot 10^{-10}$	75	$1,15 \cdot 10^{-6}$
21	Boc-Phe-Ser-Arg-AMC	22,2	$0,58 \cdot 10^{-10}$	58	$1,02 \cdot 10^{-6}$
22	H-D-Phe-Pro-Arg-AMC	24,6	$0,65 \cdot 10^{-10}$	87	$0,74 \cdot 10^{-6}$
23	Boc-Phe-Gly-Arg-AMC	25,7	$0,76 \cdot 10^{-10}$	94	$0,72 \cdot 10^{-6}$

* Siehe Anhang

Für die weiteren Messungen wurde eine 10 mM Stammlösung des Substrats **17** in 50 % DMSO hergestellt und zu den Konzentrationen 2 mM, 1 mM und 0,5 mM mit Reinstwasser verdünnt. Diese Lösungen wurden für die Messungen der Hemmkonstanten verwendet. Die Substratlösungen wurden im Messansatz nochmals 1:10 verdünnt, sodass eine DMSO-Konzentration ≤ 1 % im Messansatz resultiert.

4.8 Inhibitor-Screening mit TMPRSS2

In früheren Studien einiger Arbeitsgruppen wurde die Hemmung verschiedener trypsinartiger Serinproteasen durch substratanaloge Inhibitoren, die entweder ein 4-Amidinobenzylamid [87, 102, 103] als P1 Mimetikum oder ein arylsulfonyliertes Amid des 3-Amidinophenylalanins [90, 104, 105] enthalten, untersucht.

Obwohl bis heute keine Kristallstruktur der TMPRSS2 verfügbar ist, nahmen wir an, dass solche Verbindungen auch für die Hemmung der TMPRSS2 geeignet sein könnten, da die katalytischen Domänen der trypsinartigen Serinproteasen ein analoges Faltungsmuster und eine ähnliche Raumstruktur besitzen.

Die Bestimmung der Hemmkonstanten aller vermessenen Verbindungen erfolgte in Anlehnung an bereits für andere Proteasen beschriebene Methoden [101, 106] (s. Abschnitt 6.2.2). Die Spaltung des Substrats H-D-Cha-Pro-Arg-AMC wurde in Abhängigkeit der Zeit fluorometrisch vermessen und aus den erhaltenen *steady-state*-Geschwindigkeiten mit Hilfe der Gleichung für kompetitive Inhibitoren (Gleichung 3, siehe Seite 127) die K_i -Werte berechnet. Für die Messungen wurden in der Regel acht Inhibitorkonzentrationen, die über mindestens eine Größenordnung variiert wurden, bei je drei verschiedenen Substratkonzentrationen verwendet. Die Inhibitorkonzentrationen wurden so gewählt, dass bei der höchsten Inhibitor- und Substratkonzentration eine Restaktivität des Enzyms von etwa 10 % bestimmt wurde. Gleichzeitig wurden bei jeder Messung der Hemmkonstanten die Parameter V_{\max} und K_m parallel bestimmt. In Abbildung 4.19 sind die Graphen zur Bestimmung der K_i -Werte exemplarisch für Inhibitor **92** dargestellt (vgl. Kapitel 6.2.3.4).

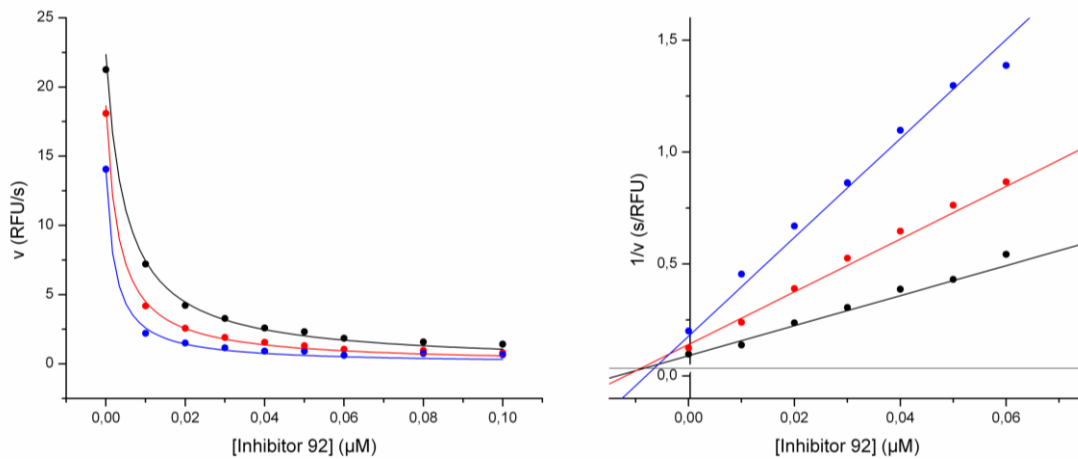


Abbildung 4.19. Bestimmung der Hemmkonstanten des Inhibitors **92** bei den Substratkonzentrationen 200 μM (schwarz), 100 μM (rot) und 50 μM (blau). Links: Auftragung der *steady-state*-Geschwindigkeiten als Funktion der Inhibitor-Konzentration und Anpassung der Messwerte an die Gleichung für reversible, kompetitive Hemmung (Gleichung 3, siehe Seite 127). Rechts: Reziproke Auftragung der Messwerte nach Dixon, die waagerechte, graue Gerade entspricht $1/v_{\text{max}}$.

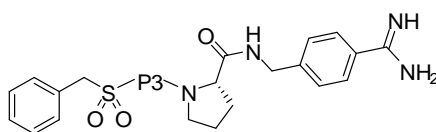
Eine alternative Methode zur Bestimmung des K_i -Werts ist die linearisierte Darstellung nach Dixon [107]. Hierfür wird der reziproke Wert der errechneten *steady-state*-Geschwindigkeiten als Funktion der Inhibitor-Konzentration aufgetragen. Im Falle einer reversiblen und kompetitiven Hemmung ergibt sich für jede Substratkonzentration eine lineare Beziehung. Die einzelnen Geraden schneiden sich im II. Quadranten, wobei der x-Wert des Schnittpunkts $-K_i$ entspricht [107].

4.8.1 Substratanaloge Inhibitoren

Zunächst wurden substratanaloge 4-Amidinobenzylamid Derivate untersucht, die schon zuvor als Hemmstoffe vieler trypsinartiger Serinproteasen, beispielsweise der HAT [84], Matriptase [89] und des Thrombins [85] beschrieben wurden.

Alle in Tabelle 4.9 zusammengefassten Verbindungen besitzen eine Benzylsulfonylgruppe in P4-Position und ein Prolin als P2-Rest, wobei nur die D-konfigurierte P3-Aminosäure modifiziert wurde.

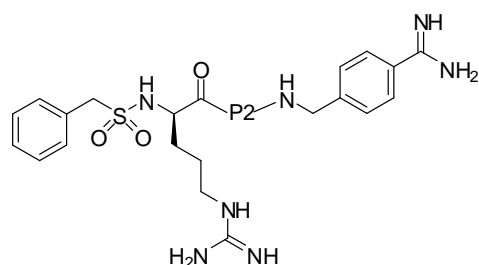
Tabelle 4.9. Modifizierung der P3-Position substratanaloger TMPRSS2-Hemmstoffe.



Inhibitor	P3	K _i (nM)
24	D-Arg	19
25	D-Asp(OtBu)	19
26	D-Lys	20
27	D- <i>homo</i> Arg	21
28	D/L- <i>homo</i> Ala(2-Pyridyl)	44
29	D- <i>homo</i> Phe	50
30	D-Phe(4-Amidino)	123
31	D-Phe	160
32	D-Lys(Cbz)	184
33	D-Glu(OtBu)	230
34	D-Val	322
35	D-Cha	335
36	D-Leu	393
37	D-Phe(4-CN)	706
38	Gly	1633
39	D-Ala	1637
40	D-Asp	7344

Die erhaltenen Hemmkonstanten lassen vermuten, dass TMPRSS2 basische aber auch hydrophobe Aminosäuren in P3-Position bevorzugt, wobei K_i -Werte um 20 nM für die wirksamsten Verbindungen (**24-27**) bestimmt wurden. Des Weiteren scheint es, dass TMPRSS2 das flexiblere *D-homo*Phe etwas besser als D-Phe in P3-Position akzeptiert. Diese Tatsache wurde auch schon für substratanaloge Inhibitoren des Blutgerinnungsfaktors Xa beobachtet [86]. Eine sehr schwache TMPRSS2-Hemmung mit K_i -Werten $> 1 \mu\text{M}$ wurden für die Derivate mit Gly (**38**), D-Ala (**39**) und D-Asp (**40**) mit negativ geladener Carboxylgruppe gefunden.

Prolin ist ein bevorzugter P2-Rest für mehrere trypsinartige Serinproteasen, speziell für Thrombin. Deshalb werden durch Einbau des P2-Prolins häufig Inhibitoren mit begrenzter Selektivität erhalten. Daher wurde in einer zweiten Serie der Einfluss verschiedener P2-Reste untersucht, wobei der geeignete D-Arg Rest in P3-Position konstant gehalten wurde (Tabelle 4.10). Diese Ergebnisse zeigten, dass der Austausch des Pro durch Ala (**41**) oder Arg (**42**) zu Inhibitoren mit vergleichbarer TMPRSS2-Hemmung führt. Jedoch besitzen die anderen Derivate dieser Serie eine reduzierte Hemmwirkung mit K_i -Werten $> 50 \text{ nM}$.

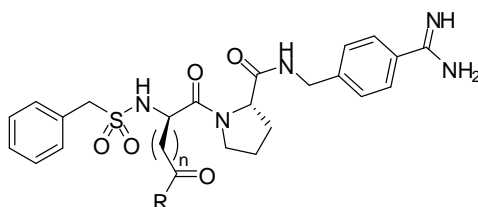
Tabelle 4.10. Modifizierung der P2-Position substratanaloger TMPRSS2-Hemmstoffe.

Inhibitor	P2	K _i (nM)
24	Pro	19
41	Ala	18
42	Arg	25
43	Lys(Cbz)	50
44	Abu	52
45	Nva	68
46	Gly	68
47	Ser	143
48	Phe	210
49	Leu	272
50	Val	409
51	Asp(OtBu)	738
52	Ile	499
53	Asp	> 10000

In einer dritten Serie wurden verwandte Verbindungen der Inhibitoren **25** und **33** untersucht, bei denen die *tert*-Butylestergruppe in der Seitenkette der P3-Aminosäuren D-Glu und D-Asp durch eine Serie von Piperazinen oder Morpholin ersetzt wurde [84] (Tabelle 4.11). Jedoch zeigten diese Verbindungen eine verminderte Hemmung gegen TMPRSS2, wobei der beste Inhibitor dieser Serie (**54**) eine 2,5-fach reduzierte Affinität

verglichen mit der Ausgangsverbindung **25** aufwies, die D-Asp(OtBu) als P3-Rest besitzt.

Tabelle 4.11. Hemmung der TMPRSS2 durch substratanaloge Inhibitoren mit Seitenketten-modifizierten D-Asp- und D-Glu-Resten in P3-Position.



Inhibitor	n	R	K _i (nM)
54	1		45
55	1		101
56	1		111
57	1		244
58	1		248
59	1		363
60	1		417
61	2		600
62	1		624
63	2		821
64	1		838
65	2		1222

Durch Messungen mit den verfügbaren substratanalogen Inhibitoren wurden einige Verbindungen mit Hemmkonstanten um 20 nM für TMPRSS2 identifiziert. Obwohl einige Beispiele für relativ spezifische substratanaloge Inhibitoren existieren, z.B. für Thrombin [103], uPA [87], oder Faktor Xa [86], besitzen diese Hemmstoffe oft nur eine begrenzte Selektivität gegen eng verwandte trypsinartige Serinproteasen. So ist beispielsweise Inhibitor **24** ein viel stärkerer Hemmstoff des Blutgerinnungsfaktors Xa ($K_i = 2,4$ nM), des Thrombins ($K_i = 3,5$ nM) und des Plasmakallikreins ($K_i = 8,3$ nM) [108]. Auch die meisten anderen Verbindungen mit Prolin in P2-Position sind in der Regel recht starke Thrombininhibitoren [84, 85]. Des Weiteren wurde eine sehr starke Hemmung des Faktors Xa mit einem K_i -Wert von 1,4 nM für Verbindung **41** beschrieben [84].

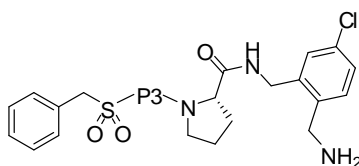
Einige trypsinartige Serinproteasen, wie Thrombin [109], Faktor Xa [110], uPA [111], Faktor VIIa [112], Plasmin und Plasmakallikrein [100] werden besonders stark durch substratanaloge Inhibitoren mit einem P4-Benzylsulfonylrest gehemmt, bei anderen Vertretern dieser Proteasefamilie ist der Einfluss des P4-Rests weniger stark ausgeprägt. Der Vergleich der Hemmkonstanten der Verbindungen **68-70** mit den analogen Benzylsulfonyl-Derivaten aus Tabelle 4.9 zeigt, dass der Benzylsulfonylrest auch im Falle der TMPRSS2-Inhibition zu einer erhöhten Affinität beiträgt (Tabelle 4.12). Interessanterweise wurde die stärkste Hemmwirkung in dieser Serie für Verbindung **66** mit einem K_i -Wert von 20 nM bestimmt, die einen ungeschützten D-homoTyrosin-Rest in P3-Position besitzt.

Tabelle 4.12. Hemmung der TMPRSS2 durch substratanaloge Inhibitoren ohne P4-Rest.

Inhibitor	P3	P2	K_i (nM)
66	D-homoTyr	Ala	20
67	D-homoPhe	Ala	90
68	D-homoPhe	Pro	180
69	D-Arg	Pro	220
70	D-Phe	Pro	2900

Die Entfernung der Benzylsulfonyl-Gruppe in P4-Position reduziert zwar die Hemmwirkung gegenüber TMPRSS2, doch ist dieser Affinitätsverlust weniger stark ausgeprägt als bei anderen Proteasen. Speziell im Falle von uPA [111] und Faktor Xa [110] konnte eine ca. 1000-fach erhöhte Hemmwirkung für die Benzylsulfonyl-Derivate im Vergleich zu ihren Analoga ohne P4-Rest gefunden werden. Analysen der Kristallstrukturen substratanaloger Inhibitoren im Komplex mit Thrombin [85], uPA [87], und Faktor Xa [110] zeigen, dass diese Benzylsulfonyl-Gruppe sehr wahrscheinlich durch starke van der Waals-Kontakte zum Phenylring des P1 4-Amidinobenzylamids die Hufeisen-ähnliche Konformation des Inhibitors stabilisiert. In diesen Kristallstrukturen bindet der Benzylsulfonyl-Rest in eine flache Tasche über der Disulfidbrücke zwischen den Cystein-Resten 220 und 191. Diese Disulfidbrücke ist bei allen trypsinartigen Serinproteasen hochkonserviert und liegt in der Nähe der S1-Bindestelle. Zur Erklärung des geringeren Einfluss der P4 Benzylsulfonyl-Gruppe auf die Hemmung der TMPRSS2 lässt sich jedoch ohne Kristallstruktur nur vermuten, dass diese Bindetasche im Falle der TMPRSS2 weniger stark ausgebildet ist.

Einige trypsinartige Serinproteasen akzeptieren *m*-Chlor-substituierte Benzylamide als P1-Rest [113]. So wurde zum Beispiel eine starke Hemmung für substratanaloge Inhibitoren des Thrombins [114] und des Faktors Xa [115] gefunden, die ein 2-(Aminomethyl)-5-chlorobenzylamid enthalten (Tabelle 4.13). Jedoch zeigten im Falle der TMPRSS2 die Inhibitoren **71-75** [85, 89] eine verminderte Affinität im Vergleich zu den analogen 4-Amidinobenzylamid-Derivaten. Die stärkste Hemmwirkung mit einem K_i -Wert von 60 nM wurde für Verbindung **71** gefunden, die ein D-Arg in P3-Position enthält.

Tabelle 4.13. Hemmung der TMPRSS2 durch substratanaloge Inhibitoren mit einem 2-(Aminomethyl)-5-chlorbenzylamid in P1-Position.

Inhibitor	P3	K _i (nM)
71	D-Arg	60
72	D-Leu	2000
73	Gly	3300
74	D-Ala	3800
75	D-Val	3800

Thrombin und Faktor Xa sind zwei Serinproteasen, die ein 2-(Aminomethyl)-5-chlorobenzylamid im Vergleich zu einem 4-Amidinobenzylamid als P1-Rest sogar bevorzugen [85, 114, 115]. Kristallstrukturanalysen mit Thrombin haben gezeigt, dass das Chloratom direkt auf das π -System des Tyr228 zeigt und es zu einer attraktiven Cl- π -Interaktion kommt [116]. Der Tyr228-Rest ist in nahezu allen trypsinartigen Serinproteasen hochkonserviert, also auch im Falle der TMPRSS2 vorhanden. Allerdings wurde für die TMPRSS2 eine 2-8fach geringere Aktivität für diese *m*-Chlor-Benzylamid-Derivate im Vergleich zu den Benzamidin-Analoga gefunden. Eine reduzierte Aktivität der substratanalog Inhibitoren mit einem chloraromatischen P1-Rest wurde ebenfalls für uPA, Plasmin, Matriptase und Trypsin beobachtet (unveröffentlichte Daten). Während Thrombin und Faktor Xa ein Alanin in Position 190 am Boden der S1-Tasche enthalten, gehören die anderen genannten Vertreter, einschließlich der TMPRSS2, zur Serin190-Subfamilie innerhalb der trypsinartigen Serinproteasen [117]. Viele Kristallstrukturen mit Proteasen der Ser190-Subfamilie zeigen, dass die Ser190-Seitenkette Wasserstoffbrückenbindungen zu einem konservierten Wassermolekül direkt oberhalb des Tyr228 ausbilden. Dieses Wasser muss für eine Bindung der chloresubstituierten aromatischen P1-Reste verdrängt werden. Deshalb kann man vermuten, dass bei Enzymen, wie Thrombin oder FXa mit einem

Ala190, die Verdrängung eines weniger stark gebundenen Wassermoleküls bei diesen Proteasen leichter möglich ist. Jedoch ist anzumerken, dass es auch Beispiele für Proteasen der Ala190-Subfamilie wie Matriptase-2 [89], HAT [101] und Plasmakallikrein (unveröffentlichte Daten) gibt, die nur schwach durch substratanaloge Inhibitoren mit einem *m*-Chlor-Benzylamid gehemmt werden.

4.8.2 Sulfonylierte Amide des 3-Amidinophenylalanins

Zur Untersuchung dieses Inhibortyps wurden zunächst die Inhibitoren **76-79** (Abbildung 4.20) enzymkinetisch vermessen. Diese Hemmstoffe wurden ursprünglich als Inhibitoren der verwandten trypsinartigen Serinproteasen Matriptase [90] und Thrombin [118] beschrieben.

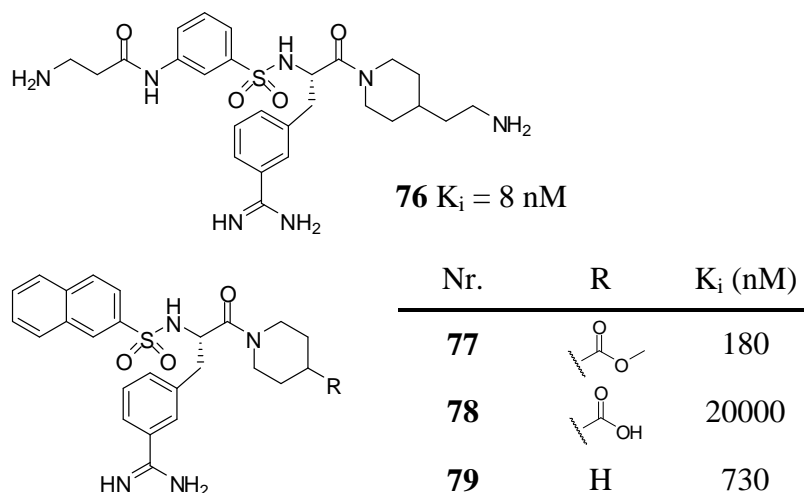
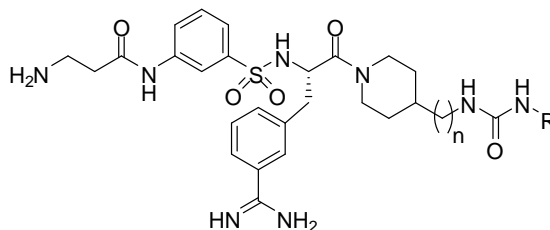


Abbildung 4.20. Hemmung der TMPRSS2 durch 3-Amidinophenylalanin-Derivate.

Für den Matriptaseinhibitor **76** wurde mit einem K_i -Wert von 8 nM ebenfalls eine starke Hemmung der TMPRSS2 gefunden. Dagegen war die Hemmwirkung durch die Thrombininhibitoren **77-79** relativ schwach. Auf Grund dieser ersten Ergebnisse wurden verwandte Matriptaseinhibitoren geprüft. Da die tribasische und stark hydrophile Verbindung **76** eine geringe Bioverfügbarkeit besitzt, wurden zunächst 3-Amidinophenylalanin-Derivate untersucht, die nur eine oder zwei basische Gruppen im Molekül enthalten. Bei den in Tabelle 4.14 gezeigten Verbindungen **80-91** wurde die C-terminale Aminoethyl-Gruppe des Inhibitors **76** durch ungeladene Harnstoffstrukturen ersetzt, der N-terminale Sulfonyl-Rest jedoch beibehalten [88].

Tabelle 4.14. Hemmung der TMPRSS2 durch 3-Amidinophenylalanin-Derivate mit C-terminaler Harnstoffstruktur.

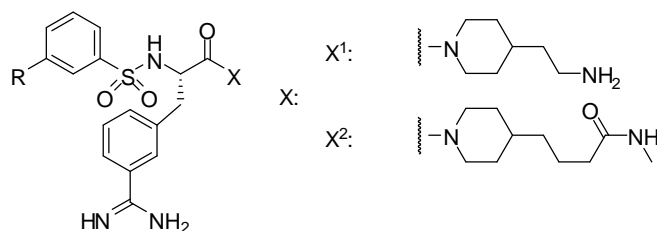


Inhibitor	n	R	K _i (nM)
80	2	H	16
81	0		74
82	2	-CH ₃	10
83	0		81
84	2	-CH ₂ -CH ₃	11
85	0		41
86	2		7
87	0		17
88	2		22
89	0		6
90	2		18
91	0		21

Einige dieser Verbindungen besitzen mit Inhibitorkonstanten um 20 nM eine vergleichbare Hemmwirkung wie die Ausgangsverbindung **76**.

In der nächsten Serie wurde das N-terminale β -Alanylamid durch substituierte Phenylgruppen ersetzt, wobei zwei verschiedene C-terminale Piperidid-Reste verwendet wurden (Tabelle 4.15) [88, 119].

Tabelle 4.15. Hemmung der TMPRSS2 durch Biphenyl-3-sulfonyl-Derivate des 3-Amidino-phenylalanins.

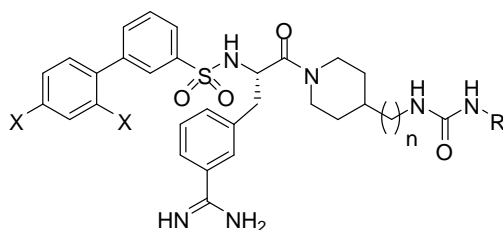


Inhibitor	X	R	K _i (nM)
92	X ¹		0,9
93	X ²		4,0
94	X ¹		1,0
95	X ²		4,5
96	X ¹		2,7
97	X ²		19
98	X ¹		4,8
99	X ¹		5,4
100	X ¹		7,3
101	X ¹		7,8
102	X ²		17
103	X ¹		8,9
104	X ²		36
105	X ¹		28
106	X ²		72
107	X ¹		28
108	X ²		40
109	X ¹		72
110	X ²		207

Generell besitzen alle dibasischen Inhibitoren eine 3-6fach höhere Affinität zur TMPRSS2 im Vergleich mit den analogen monobasischen Strukturen. Die stärkste Hemmung wurde für die Verbindungen **92** und **94** mit K_i -Werten von 0,9 und 1,0 nM bestimmt.

In einer weiteren Serie wurden die Analoga **111-114** (Tabelle 4.16) vermessen, bei denen die geeignetsten N-terminalen Biphenyl-3-sulfonyl-Gruppen mit bevorzugten Harnstoff-substituierten Piperididen kombiniert wurden. Dadurch wurden monobasische Verbindungen erhalten [88], die TMPRSS2 sehr wirksam im niedrig nanomolaren Bereich hemmen. Die wirksamsten Inhibitoren dieser Serie sind die beiden Cyclohexyl-Harnstoff Derivate **113** und **114** mit K_i -Werten ≤ 5 nM.

Tabelle 4.16. Hemmung der TMPRSS2 durch monobasische 3-Amidinophenylalanin-Derivate.



Inhibitor	X	n	R	K_i (nM)
111	CH ₃ -O-	2	-CH ₃	13
112	Cl	2		11
113	CH ₃ -O-	0		3
114	Cl	0		5

Die Ergebnisse der enzymkinetischen Messungen zeigten, dass die 3-Amidinophenylalanin-Derivate [90] im Vergleich zu den substratanalogen Inhibitoren eine deutlich stärkere Hemmwirkung besitzen. Innerhalb der ersten Serie mit einer β -Alanylamid Substitution der Phenyl-3-sulphonyl-Gruppe und substituierten ungeladenen Harnstoff-Strukturen am Piperidid-Rest wurden zwei Verbindungen [88] mit K_i -Werte < 10 nM identifiziert (**86**, **89**, Tabelle 4.14). Die Inhibitoren der zweiten Serie wurden an ihrer N-terminalen Sulfonyl-Gruppe und am C-terminalen Piperidid-Rest modifiziert. Die Verbindungen **92** und **94** besitzen Hemmkonstanten ≤ 1 nM und sind somit die wirksamsten bisher beschriebenen TMPRSS2-Inhibitoren. Beide Verbindungen besitzen eine 2',4'-dichloro- oder dimethoxy-substituierte Biphenyl-3-sulfonyl-Gruppe am N-Terminus und einen C-terminalen 2-Aminoethyl-Piperidid-Rest. Die einfach Chlor-substituierten Biphenylsulfonyl-Derivate **99** und **100** zeigen eine deutlich geringere Hemmwirkung. Bei allen Beispielen, die in Tabelle 4.15 zusammengefasst sind, zeigen die dibasischen Inhibitoren mit einem C-terminalen 2-Aminoethylpiperidid eine stärkere Hemmung im Vergleich zu ihren monobasischen 4-Piperidylbutanoyl-Methylamid Analoga, obwohl die Verbindung **93** und **95** TMPRSS2 noch sehr stark mit K_i -Werten ≤ 5 nM inhibieren. Eine ähnliche Wirksamkeit wurde für die monobasischen Benzamidin-Derivate **113** und **114** gefunden, die durch Kombination der besten N-terminalen Biphenyl-sulfonyl-Gruppe mit besonders geeigneten Harnstoff-substituierten Piperididen erhalten wurden. Im Prinzip sollte es auch möglich sein, nicht-basische TMPRSS2-Inhibitoren mit einer verbesserten Bioverfügbarkeit durch Verwendung bekannter Benzamidin-Prodrug-Strategien zu entwickeln [120]. So wurde zum Beispiel die Umsetzung des Benzamidins in ein Hydroxyamidin oder die Acylierung mit einem Hexyloxycarbonylrest erfolgreich bei der Entwicklung der oral bioverfügbaren Thrombininhibitoren Ximelagatran und Dabigatran angewendet.

Die Ergebnisse der enzymkinetischen Messungen ergaben, dass die Hemmkonstanten für die TMPRSS2 ungewöhnlich stark mit den K_i -Werten der Matriptase korrelieren. Für 67 Verbindungen wurden Hemmkonstanten für beide Proteasen bestimmt, die als pK_i -Werte in Abbildung 4.21 gegeneinander aufgetragen sind.

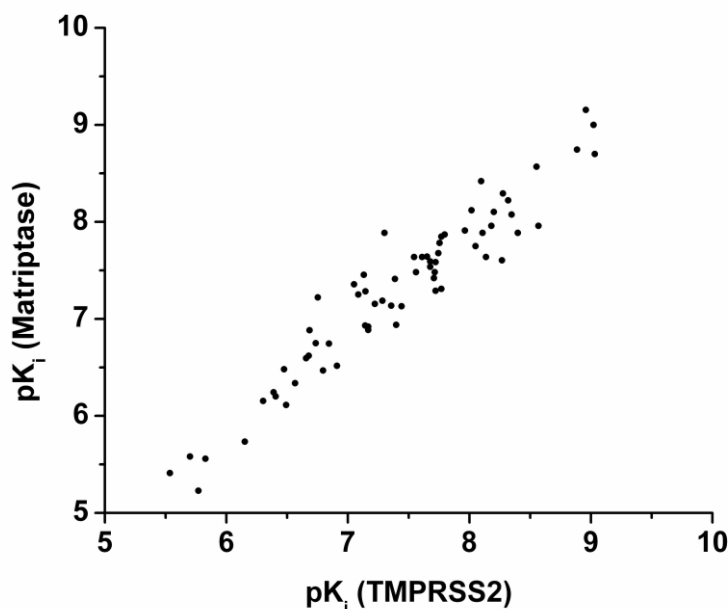


Abbildung 4.21. Korrelation der berechneten pK_i -Werte für die Hemmung der TMPRSS2 und Matriptase ($n = 67$ Inhibitoren).

Aufgrund der fehlenden Kristallstruktur für die TMPRSS2 kann das Vorhandensein der fast identischen Hemmwirkungen nicht erklärt werden. Interessanter Weise besitzen beide Proteasen eine sehr ähnliche P4-P4' Autoaktivierungssequenz, die RQSR↓IVGG im Falle der TMPRSS2 und RQAR↓VVGG im Falle der Matriptase ist (UniProt accession codes O15393 und Q9Y5Y6). Dies könnte auf eine Redundanz in Bezug auf die Umsetzung physiologisch relevanter Substrate zwischen diesen beiden Proteasen hindeuten.

(2any.pdb) [126] ausgewählt, die eine Sequenzidentität von 41,6 % zur TMPRSS2 aufweist. Anschließend erfolgte eine Überlagerung mit einer Kristallstruktur des Thrombins im Komplex mit dem Inhibitor **92**, der auch der wirksamste TMPRSS2-Hemmstoff ist (4e7r.pdb) [88]. Danach wurde die Struktur des Thrombins gelöscht, somit wurde ein Modell des Inhibitors **92** in der TMPRSS2 erhalten. Da sich ein sterischer Konflikt des Inhibitors mit der Seitenkette des Lys99 ergab, wurde mit der Software MOE (Molecular Operating Environment) eine Energieminimierung des Komplexes im Bereich des aktiven Zentrums durchgeführt, wobei das Rückgrat der TMPRSS2 fixiert und nur die Seitenketten energieminiert wurden. Zusätzlich wurde der Torsionswinkels zwischen C_α und C_β des Ser190 manuell gedreht. Dadurch konnte sich eine typische Wasserstoffbrückenbindung zu einem protonierten Stickstoff der Amidinogruppe des Inhibitors ausbilden, die aus vielen anderen Strukturen von Benzamidinderivaten im Komplex mit Trypsin [127], Urokinase [87] und Matriptase [90] bekannte ist. Diese Wechselwirkung wird normalerweise noch durch ein hochkonserviertes Wassermolekül stabilisiert, das jedoch im Homologiemodell fehlt. In Abbildung 4.23 ist das berechnete Modell der Proteasedomäne und in Abbildung 4.24 ein Ausschnitt des aktiven Zentrums der TMPRSS2 dargestellt.

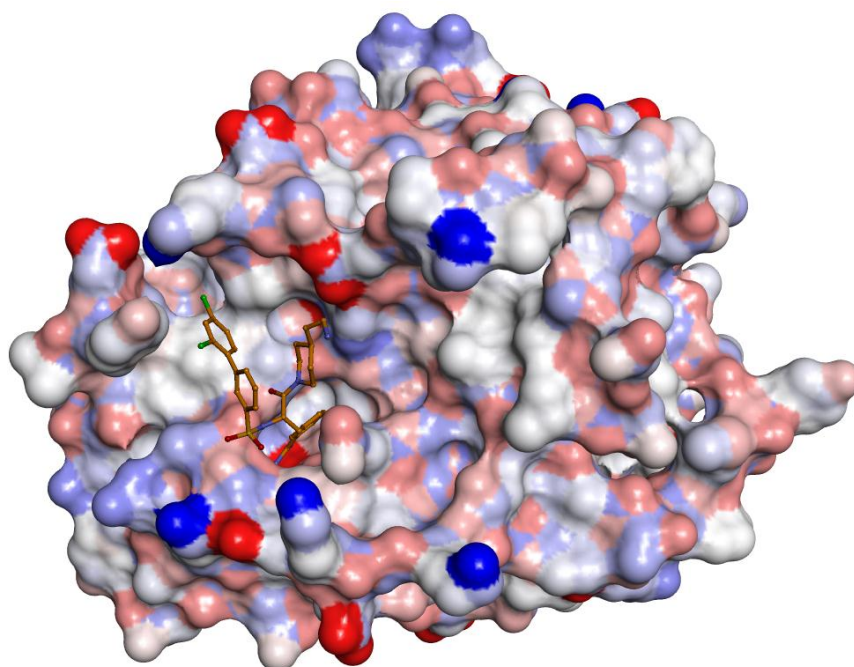
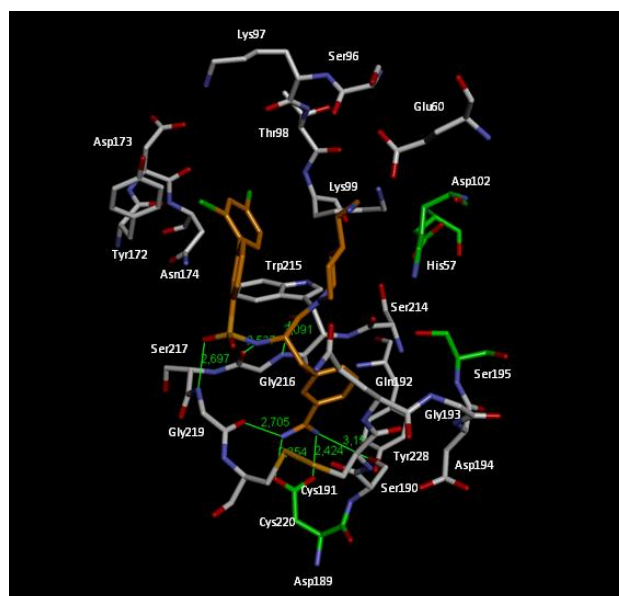
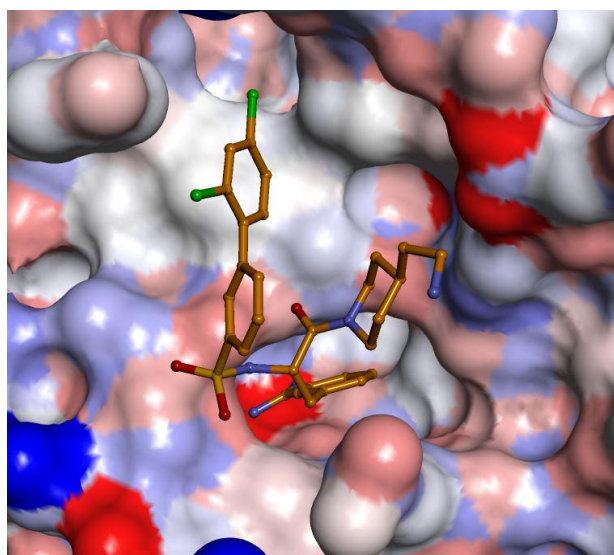


Abbildung 4.23. Homologiemodell der TMPRSS2 überlagert mit dem Inhibitor **92** aus der Kristallstruktur im Komplex mit Thrombin (4e7r.pdb). Die TMPRSS2 ist als volles Kugelmodell und der Inhibitor als Gitterstruktur dargestellt.



Dieses Homologiemodell der TMPRSS2 zeigt alle charakteristischen Wechselwirkungen, die aus anderen Kristallstrukturen verwandter 3-Amidinophenylalanin-Derivate mit trypsinartigen Serinproteasen bekannt sind [90, 127]. So bildet die Amidinogruppe eine doppelte Salzbrücke zu Asp189 und Wasserstoffbrückenbindungen zu Gly219 und Ser190 aus. Dazu gehören auch die beiden antiparallelen H-Brücken zwischen dem Rückgrat des 3-Amidinophenylalanins und Gly216, sowie eine weitere Wasserstoffbrücke zwischen einem Sulfonyl-Sauerstoff mit dem NH des Gly219.

Die Qualität des Homologiemodells wurde mittels der Ramachandran-Diagramme bewertet, die mit der Software MOE generiert wurden (Abbildung 4.26).

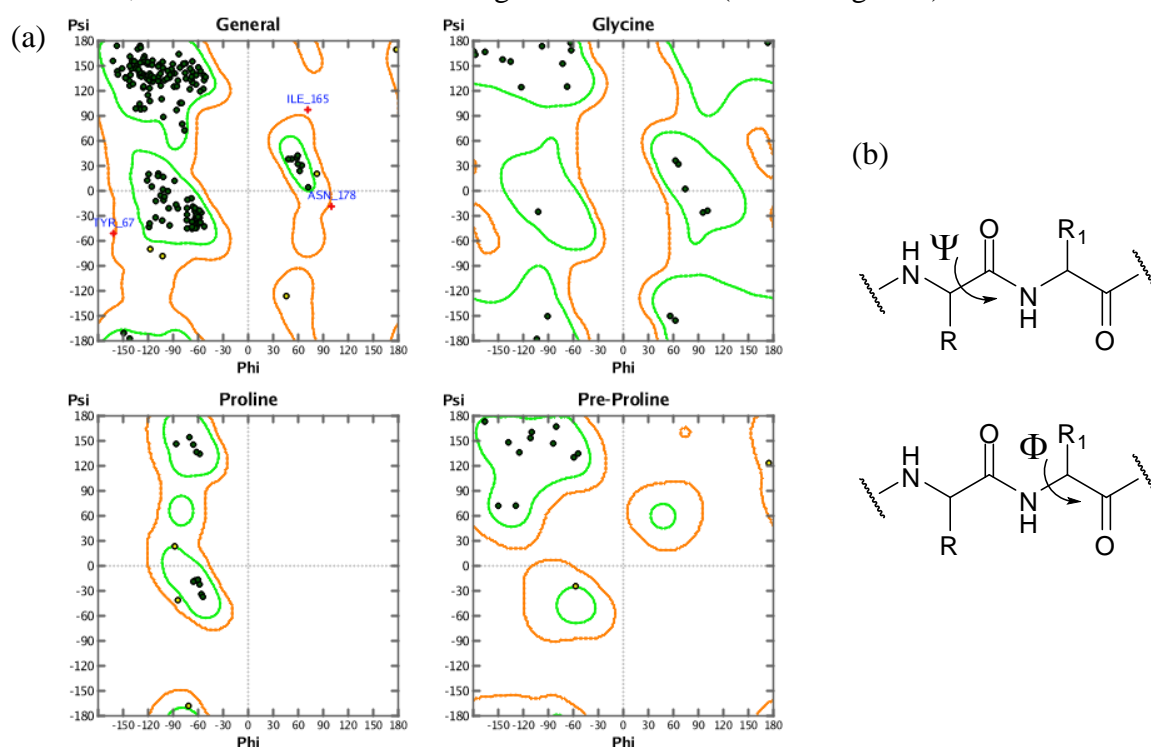


Abbildung 4.26. (a) Ramachandran-Diagramme des TMPRSS2 Modells; (b) Torsionswinkel phi (Φ) und psi (Ψ) des Rückgrats von Peptidbindungen.

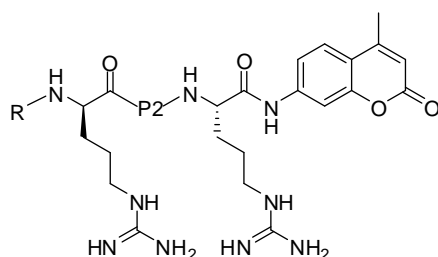
Das Gesamtdiagramm (Abbildung 4.26, oben links) zeigt drei Aminosäuren, deren Torsionswinkel leicht außerhalb des erlaubten Bereichs liegen. Jedoch wurde auf eine weitere Energieminimierung verzichtet, da die Reste Tyr67(78)² und Asn178(187) ins Lösungsmittel gerichtet sind und Ile165(176) einen Abstand von ca. 10 Å zum aktiven Zentrum hat. So kann ausgeschlossen werden, dass diese Aminosäuren die Bindung des Inhibitors direkt beeinflussen.

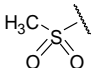
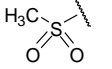
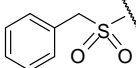
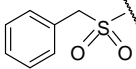
² Chymotrypsinnummerierung in Klammern angegeben

4.10 Neue fluorogene Substrate der TMPRSS2

Obwohl H-D-Cha-Pro-Arg-AMC (**17**) als bestes Fluoreszenzsubstrat der TMPRSS2 in einem initialen Screen identifiziert werden konnte und daher für die folgenden kinetischen Messungen mit den Inhibitoren verwendet wurde, besitzt es nur einen moderaten K_m -Wert. Durch die Untersuchungen mit den substratanalogen Hemmstoffen wurde gefunden, dass TMPRSS2 eine Präferenz für basische P3-Aminosäuren in D-Konfiguration hat. Aus diesem Grund wurde eine neue Serie fluorogener AMC-Substrate synthetisiert, die einen geschützten oder freien D-Arginin Rest in P3-Position enthalten, wobei Prolin oder Glycin als P2 Gruppen verwendet wurden (Tabelle 4.17).

Tabelle 4.17. Neue fluorogene Substrate mit D-Arginin in P3-Position.



Substrat	MI-Nr.	R	P2	V_{\max} (M/s)	K_m (μ M)	V_{\max}/K_m (s^{-1})
115	MI-0507		Pro	$6,45 \cdot 10^{-10}$	2,9	$2,23 \cdot 10^{-4}$
116	MI-0508		Gly	$5,71 \cdot 10^{-10}$	2,9	$1,95 \cdot 10^{-4}$
117	MI-0502		Gly	$4,43 \cdot 10^{-10}$	2,7	$1,64 \cdot 10^{-4}$
118	MI-0503		Pro	$4,57 \cdot 10^{-10}$	3,8	$1,20 \cdot 10^{-4}$
119	MI-0502	Cbz	Gly	$1,97 \cdot 10^{-10}$	4,7	$0,42 \cdot 10^{-4}$
120	MI-0503	Cbz	Pro	$3,13 \cdot 10^{-10}$	11,1	$0,28 \cdot 10^{-4}$
121	MI-0506	H	Gly	$1,35 \cdot 10^{-10}$	7,0	$0,19 \cdot 10^{-4}$
122	MI-0507	H	Pro	$1,83 \cdot 10^{-10}$	9,7	$0,19 \cdot 10^{-4}$

Alle diese neuen Substrate zeigten einen signifikant reduzierten K_m -Wert und in den meisten Fällen zusätzlich größere V_{max} -Werte im Vergleich zum Referenzsubstrat **17** ($V_{max} = 1,43 \cdot 10^{-10}$ M/s und $K_m = 43 \mu\text{M}$). Die besten AMC-Derivate **115** und **116** haben eine Methylsulfonylgruppe in P4-Position, wobei lediglich marginale Unterschiede bei der Verwendung von Prolin oder Glycin als P2-Rest gefunden wurden. Beide Substrate besitzen etwa 60-fach verbesserte V_{max}/K_m -Werte. Durch den Einbau des D-Arginins sind beide Verbindungen sehr gut wasserlöslich und erfordern kein DMSO zur Herstellung der Substratstammlösungen.

4.11 Synthese der Substrate

Die Synthese der in Tabelle 4.17 dargestellten Substrate erfolgte nach bekannten Methoden und ist exemplarisch für das Substrat **115** in Abbildung 4.27 dargestellt.

Zunächst wurde an die kommerziell erhältliche Aminosäure H-D-Arg(Pbf)-OH der Methylsulfonylrest (**123**) im basisch-wässrigen Milieu unter Schotten-Baumann-Bedingungen eingeführt (**124**) [128]. Das Methylsulfonylchlorid wurde portionsweise mit ca. vierfachem Überschuss zugegeben, da es in wässriger Lösung rasch hydrolysiert [128]. Zur Synthese des P2-P1'-Segmentes (**126**) wurde das kommerziell erhältliche H-Arg-AMC mit Boc-Pro-OSu (**125**) und DIPEA in DMF umgesetzt und anschließend die Boc-Schutzgruppe mit 90 %iger TFA mit 10 % Wasser abgespalten. Die finale Kopplung erfolgte mittels PyBOP [129] und DIPEA in DMF. Im letzten Reaktionsschritt wurde schließlich die Pbf-Schutzgruppe in 90 %-iger TFA abgespalten (**115**).

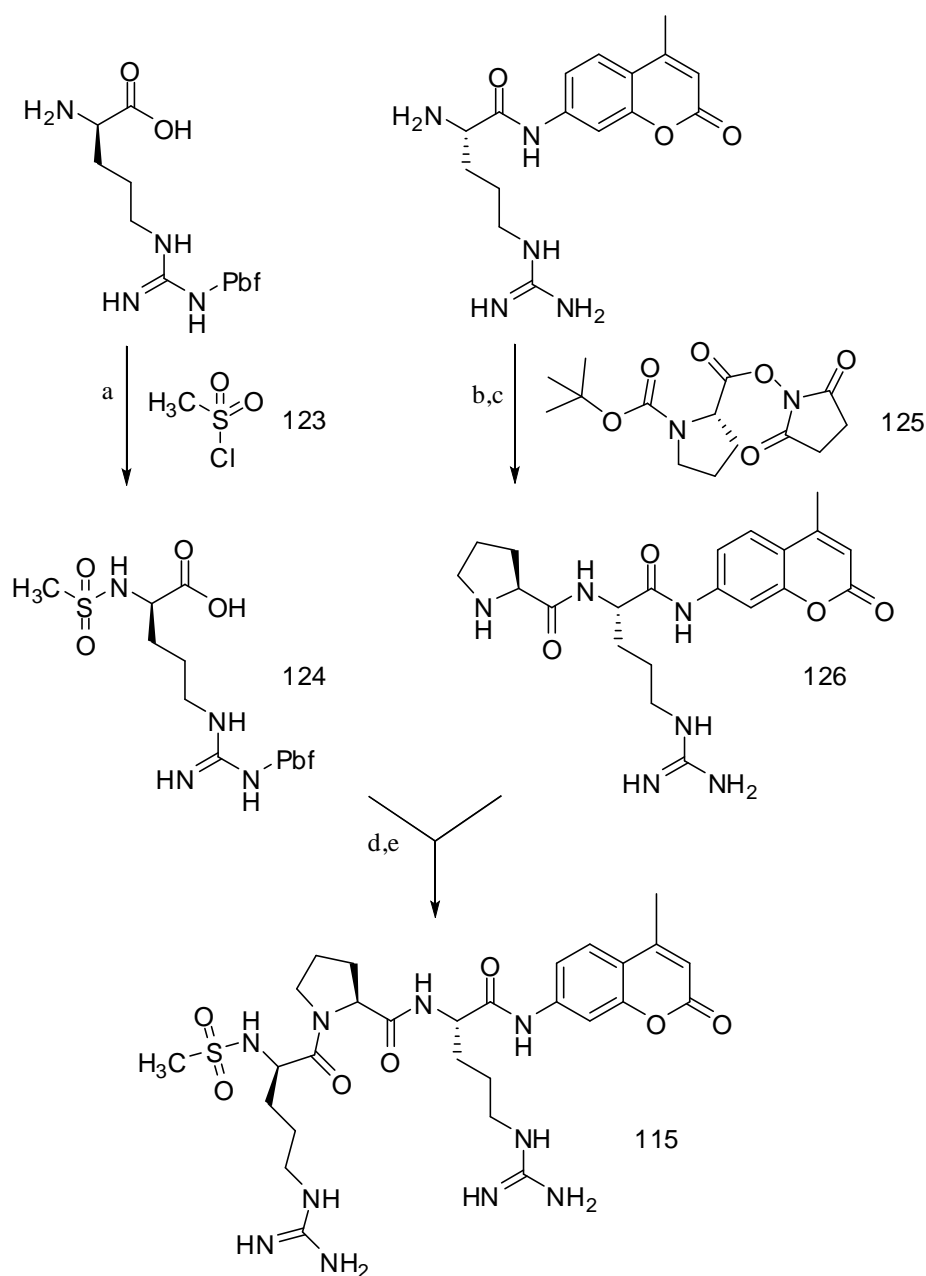


Abbildung 4.27. Synthese des fluorogenen Substrats Mes-D-Arg-Pro-Arg-AMC (**115**). (a) Schrittweise Zugabe von Methylsulfonylchlorid und DIPEA in Acetonitril und Wasser (1:1) bei 0 °C für 60 min; (b) DIPEA in DMF bei 0 °C für 15 min, anschließend Raumtemperatur für 12 h; (c) 90 % TFA für 1,5 h; (d) PyBOP und DIPEA in DMF bei 0 °C für 30 min, anschließend Raumtemperatur für 12 h; (e) 90 % TFA bei Raumtemperatur für 2,5 h und Reinigung mittels präparativer HPLC.

4.12 Untersuchungen zur Hemmung der Virusausbreitung³

Wie einleitend beschrieben, wird das Oberflächenprotein Hämagglutinin (HA) von Inflenzaviren als Vorläuferprotein HA0 synthetisiert und muss durch Wirtsproteasen in die Untereinheiten HA1 und HA2 gespalten werden (siehe Kapitel 1.5).

Zunächst wurden bronchiale Calu-3 Epithelzellen des Respirationstrakts verwendet, um den Effekt der TMPRSS2-Inhibitoren auf die HA-Aktivierung und multizyklische Replikation der Viren zu untersuchen. Diese Zellen exprimieren TMPRSS2 und sind für die Aktivierung von humanen Inflenzaviren geeignet [130].

Zuerst war es notwendig zu prüfen, ob die Behandlung der Calu-3 Zellen mit den besten Inhibitoren **92**, **93**, **113** und **114** die Zellvitalität beeinflussen. Dafür wurden die Zellen mit 10 oder 50 μM der Inhibitoren für 48 Stunden inkubiert und anschließend die Vitalität mit Hilfe eines quantitativen MTT-Tests untersucht, wobei unbehandelte Zellen als Kontrolle verwendet wurden (Abbildung 4.28).

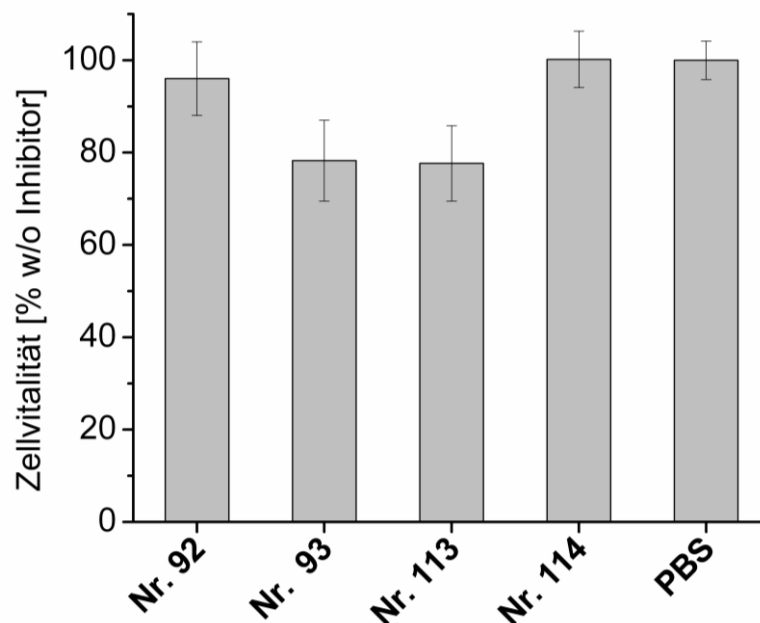


Abbildung 4.28. Quantitativer Vitalitätstest von Calu-3 Zellen in Abwesenheit (PBS) und Anwesenheit von 50 μM der Inhibitoren **92**, **93**, **113** und **114** über 48 Stunden.

³ Die in diesem Abschnitt beschriebenen Untersuchungen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Garten am Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg von Dr. Eva Friebertshäuser, Dr. Joanna Baron und Catharina Freuer durchgeführt.

Bei Verwendung einer 10 μM Inhibitorkonzentration konnte keinerlei zytotoxische Wirkung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Auch eine Konzentration von 50 μM der Inhibitoren **92** und **114** zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Zellen. Jedoch kam es bei Behandlung mit 50 μM der Inhibitoren **93** und **113** zu einer Reduktion der Zellvitalität von 20 %. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde Inhibitor **92** für weitere Studien ausgewählt, da es sich auch um den stärksten TMPRSS2-Inhibitor handelt.

Zur Untersuchung der Hemmung der HA-Aktivierung und Virusausbreitung wurden Calu-3 Zellen mit dem humanen, pandemischen Virus A/Aichi/2/68 (H3N2) oder A/Hamburg/5/09 (H1N1) bei niedriger MOI von 0,0001 infiziert und in Anwesenheit der Verbindung **92** mit einer Konzentration von 10 oder 50 μM für 72 Stunden inkubiert. Zur Kontrolle wurden Zellen in Abwesenheit des Inhibitors infiziert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden die Virustiter durch einen Plaque-Test bestimmt und die virusenthaltenden Zellüberstände unter Verwendung einer SDS-PAGE und anschließendem Western Blot bezüglich der HA-Spaltung analysiert.

Abbildung 4.29 zeigt, dass die Virusausbreitung in einer dosisabhängigen Weise durch Inhibitor **92** gehemmt wird. Die Behandlung der Zellen mit der niedrigen Inhibitorkonzentration von 10 μM führt zu einer 10- bzw. 100-fachen Reduktion der Virustiter von A/Hamburg H1N1 und A/Aichi H3N3 nach 48 Stunden und einer 10-fachen Reduktion nach 72 Stunden. Durch eine Behandlung mit 50 μM Inhibitor wird die Virusausbreitung stark unterdrückt und führt zu einer 100-1000-fachen, 1000-10000-fachen und 100fachen Reduktion der Virustiter nach 24, 48 und 72 Stunden. Die Spaltung des HAs der Virusnachkommen, wurde durch einen Western Blot nach 72 Stunden analysiert. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen wurde mit 10 μM Inhibitor nur eine geringe Reduktion der HA-Spaltung gefunden (4.29b).

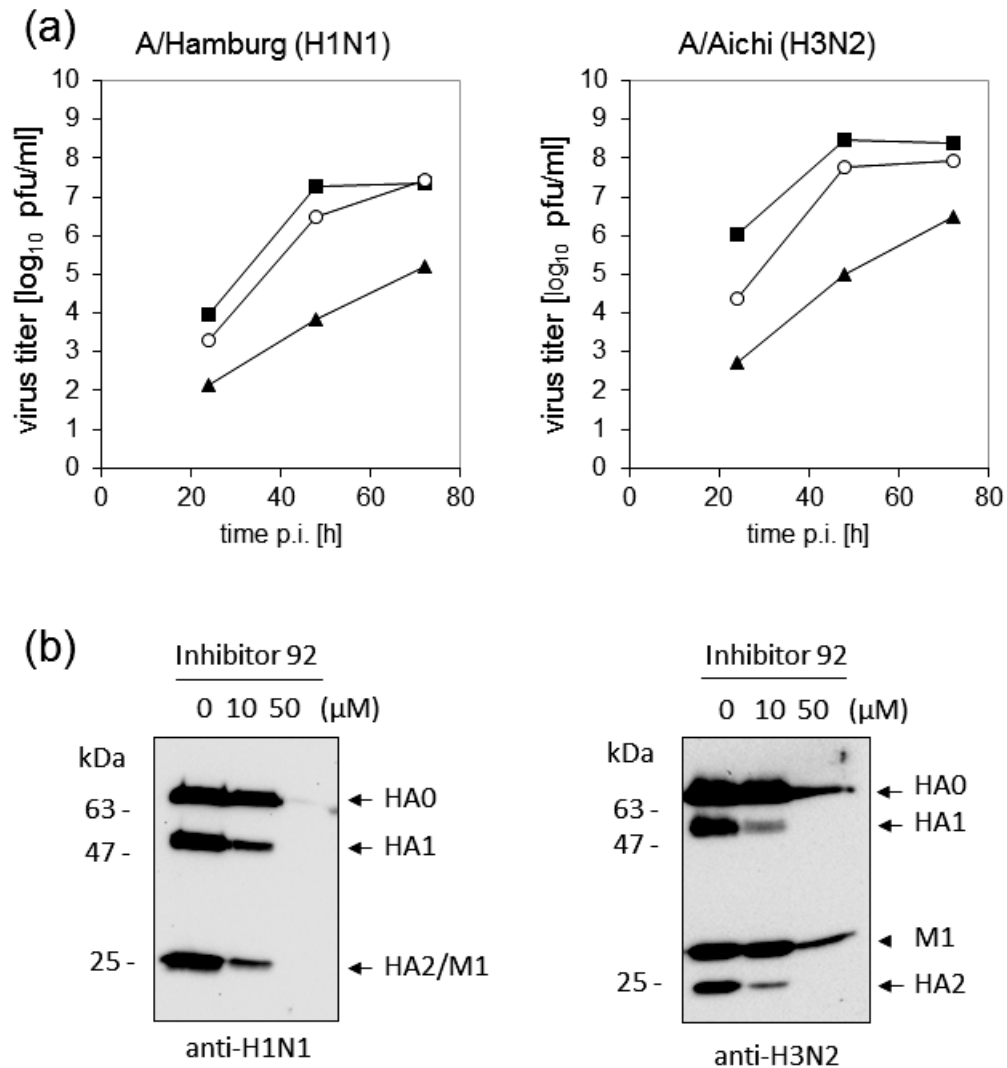


Abbildung 4.29. Hemmung der Virusausbreitung durch Inhibitor **92**. (a) Hemmung der multizyklischen Replikation der Influenzaviren A/Aichi/2/68 (H3N2) oder A/Hamburg/5/09 (H1N1) in Calu-3 Zellen in Abwesenheit (■) oder unter Verwendung von 10 (○) oder 50 (▲) μM des Inhibitors **92**. Zu verschiedenen Zeitpunkten (24, 48 und 72 h p.i.) wurde die Menge des aktivierten Virus, die ins Medium abgegeben wird, mittels Plaque-Test als pfu pro mL bestimmt. (b) Hemmung der HA-Spaltung durch Verbindung **92**. Die Spaltung des HA wurde bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen nach 72 h p.i. bestimmt. Die Virusvermehrung wurde immunchemisch mit spezifischen Antikörpern gegen H1 oder H3 mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht, wobei nur der H3-Antikörper das virale M1 Protein detektiert. Auf Grund der starken Hemmung der Virusausbreitung konnten nach Behandlung mit 50 mM des Inhibitors nur geringfügige Mengen der Virusproteine detektiert werden.

Dagegen bewirkte die Behandlung der Zellen mit 50 μM Inhibitor eine drastische Reduktion der Virusvermehrung. Dabei wird generell nur wenig HA gebildet. Deshalb waren nur schwache Banden an ungespaltenem HA detektierbar, jedoch wurden

keinerlei Spaltprodukte identifiziert. Diese Daten zeigen, dass die Hemmung der HA-Aktivierung durch Inhibierung der TMPRSS2 mittels Verbindung **92** die Virusausbreitung in Calu-3 Zellen stark reduziert. Daher könnten diese Verbindung oder deren Analoga vielversprechende Kandidaten zur Behandlung von Influenzainfektion sein, vor allem in Kombination mit anderen antiviralen Wirkstoffen.

Zusätzlich zu den Versuchen mit Calu-3 Zellen wurde die Hemmwirkung einiger Inhibitoren auf die Replikation und Ausbreitung der Influenzaviren in modifizierten MDCK-Zellen geprüft. In diesen Zellen kann durch Zugabe von Doxycyclin die Expression der TMPRSS2 induziert werden (siehe Abschnitt 1.5) und eignen sich daher zur Untersuchung der HA-Spaltung durch TMPRSS2. Nach Infektion der Zellen mit Influenzaviren wurden die Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Um eine multizyklische Virusausbreitung zu ermöglichen, wurden die Zellen für 24 Stunden inkubiert. Die immunhistochemische Anfärbung der Viren erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen ihr Nucleoprotein. Dabei zeigt eine Blaufärbung sowohl infizierte Zellen als auch die kometenartige Virusausbreitung auf benachbarte Zellen an. Bei den Kontrollen ohne Hemmstoff kam es zu einer intensiven Blaufärbung, was auf eine effektive Virusausbreitung hinweist. Je weniger die Zellen nach Inhibitorzugabe anfärbbar sind, desto stärker wird die Virusreplikation gehemmt.

In dieser Versuchsreihe wurden die wirksamsten Hemmstoffe gegen TMPRSS2 beider Inhibitortypen, die im Rahmen dieser Arbeit identifiziert werden konnten, getestet (Abbildung 4.31). Neben der substratanalogen Verbindung Bzls-D-Arg-Pro-4-Amba (**24**) ($K_i = 19 \text{ nM}$) und dem vom 3-Amidinophenylalanin abgeleiteten Inhibitor **92** ($K_i = 0,9 \text{ nM}$) wurde dessen monobasisches Analogon **93** ($K_i = 4,0 \text{ nM}$) und ein deutlich hydrophoberer Inhibitor **123** ausgewählt. Es wurde vermutet, dass die stark polaren, mono- oder dibasischen Verbindungen **24**, **92** und **93** nur eine geringe Zellpermeabilität besitzen. Da es Hinweise darauf gibt, dass TMPRSS2 Influenzaviren durch die HA-Spaltung innerhalb der Zelle aktiviert, ist für die Virushemmung eine zelluläre Aufnahme der Inhibitoren notwendig. Deshalb wurde auch die deutlich hydrophobere Verbindung **123** zum Vergleich untersucht, obwohl für diesen Inhibitor nur eine marginale Hemmung der TMPRSS2 $> 500 \mu\text{M}$ gefunden wurde. Diese Verbindung

besitzt neben dem P1 4-Amidinobenzylamid und dem N-terminalen Benzylsulfonylrest ein hydrophobes, decanoyliertes Lysin in P2- und ein D-Cyclohexylalanin in P3-Position (Abbildung 4.30).

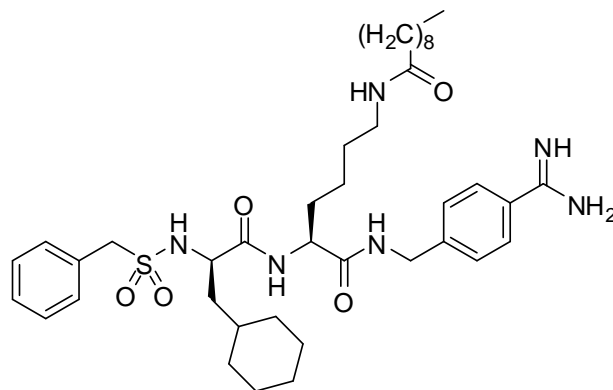


Abbildung 4.30. Strukturformel der hydrophoben Verbindung **123**.

Als Kontrolle wurde der irreversible Serinproteaseinhibitor Pefabloc® SC verwendet. Dieser Inhibitor unterdrückt bei einer Konzentration von 50 µM die Virusvermehrung fast vollständig. Während in der inhibitorfreien Kontrolle ohne Doxycyclinzugabe nur einzelne, initial infizierte Zellen nachweisbar waren, konnte in den Zellen nach Doxycyclin-induzierter TMPRSS2-Expression eine multizyklische Virusreplikation und Ausbreitung der Infektion gezeigt werden.

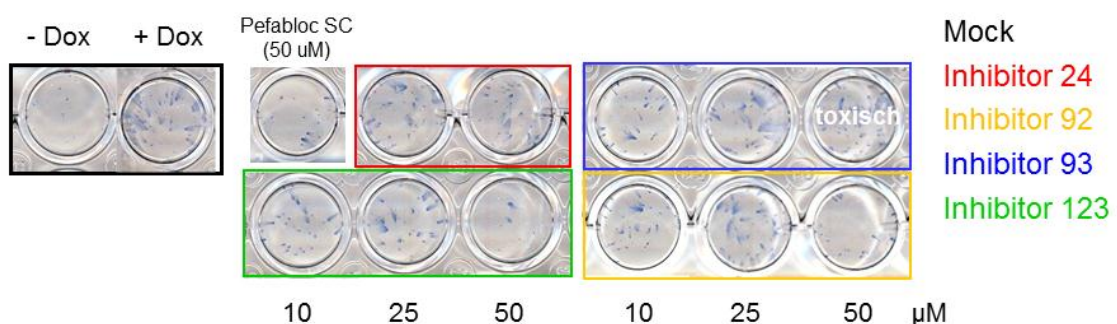


Abbildung 4.31. Vermehrung der Influenzaviren in MDCK-TMPRSS2 Zellen. Die Zellen wurden mit dem Influenza A/Hamburg/5/09 (H1N1) Subtyp infiziert und mit dem jeweiligen Inhibitor in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die infizierten Zellen immunhistologisch angefärbt.

Die stärkste Hemmung der Virusausbreitung bei einer Konzentration von 50 μM bewirkte die hydrophobe Verbindung **123** und Inhibitor **92**, der als stärkster Hemmstoff der TMPRSS2 im Rahmen dieser Arbeit identifiziert werden konnte. Die Verbindung **93** zeigte auch in diesem Versuch bei einer Konzentration von 50 μM eine gewisse Zelltoxizität, die bereits im vorher beschriebenen MTT-Test gefunden wurde. Die Hemmung der Virusausbreitung durch Inhibitor **24** ist im Falle der TMPRSS2 relativ schwach und viel geringer im Vergleich zu analogen Versuchen mit Doxycyclin-aktivierbaren HAT-MDCK-Zellen. In diesen wird durch Inhibitor **24** auch in niedrigeren Konzentration bei 10 μM die Virusausbreitung fast vollständig unterdrückt [101]. Dies lässt vermuten, dass die proteolytisch aktive HAT, die vorwiegend auf der Zelloberfläche exprimiert wird, leichter für den polaren, dibasischen Inhibitor zugänglich ist. Dagegen ist der Hemmstoff **24** (Bzls-D-Arg-Pro-4-Amidinobenzylamid) sehr wahrscheinlich nur in sehr geringem Maße zellpermeabel.

5 Zusammenfassung

Es ist bekannt, dass TMPRSS2 und HAT das Hämagglutinin der Influenza-Subtypen H1, H2, H3 und H9 aktivieren, dagegen spaltet Matriptase nur das Hämagglutinin einiger Subtypen mit di- oder tribasischer Schnittstelle (vor allem H9). Die Identifizierung wirksamer Inhibitoren dieser Proteasen könnte daher ein Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer antiviraler Wirkstoffe zur Therapie der Grippe sein. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit die hämagglutininspaltenen Proteasen TMPRSS2, HAT und Matriptase für weitergehende enzymkinetische Untersuchungen in *E.coli* exprimiert. In unserem Arbeitskreis wurden bereits Inhibitoren der Matriptase und der HAT entwickelt. Daher wurde in dieser Arbeit nur die TMPRSS2 mit verfügbaren Inhibitoren trypsinartiger Serinproteasen untersucht. Auf Grund der Ergebnisse mit den substratanalogen Inhibitoren ist es gelungen, neue, effiziente Fluoreszenzsubstrate der TMPRSS2 zu entwickeln. Dabei wurden die folgenden Ergebnisse erhalten.

5.1 Expression, Rückfaltung und Aktivierung der Matriptase

Nach Transformation des für die katalytische Domäne codierenden Expressionsplasmids pET(24)b-Matriptase in den *E.coli*-Stamm BL21Gold(DE3) wurde die Protease bei 37 °C für 3 Stunden exprimiert, wobei die Bakterienkultur vor der Induktion für 2,5 Stunden bei 37 °C inkubiert wurde.

Die Rückfaltung der Matriptase erfolgte gemäß eines früher beschriebenen Verfahrens unter Verwendung der *rapid dilution* Methode [90]. Da die Rückfaltung der Matriptase entsprechend der Literaturmethoden nur mit signifikant geringeren Ausbeuten reproduziert werden konnte, wurde versucht, den Renaturierungspuffer zu optimieren. Da dies jedoch nicht gelungen ist, wurde für weitergehende Präparationen das aus der Literatur bekannte Standardprotokoll verwendet. Nach Aktivierung mit DAPase und finaler chromatographischer Reinigung wurde aktive Matriptase erhalten.

5.2 Klonierung, Expression, Rückfaltung und Aktivierung der HAT

Zunächst wurde das für die katalytische Domäne der HAT codierende Gen in den Vektor pET24(b) kloniert, der die rekombinante Expression in *E.coli* ermöglicht. Dabei wurden die Primer so gewählt, dass am N-terminalen Ende des Proteins zusätzlich die Aminosäuresequenz Met-Lys-(His)₆ exprimiert wird. Dadurch wurde die Reinigung der HAT über eine Affinitätschromatographie ermöglicht. Anschließend wurden die optimalen Expressionsbedingungen für dieses Protein ermittelt. Nach Rückfaltung und N-terminaler Aktivierung mit DAPase konnte jedoch keine aktive HAT erhalten werden. Da die HAT mittlerweile kommerziell erhältlich ist, wurden keine weiteren Versuche zu ihrer Herstellung unternommen.

5.3 Klonierung, Expression, Rückfaltung und Aktivierung der TMPRSS2

Anfänglich wurde das Gen für die katalytische Domäne der trypsinartigen Serinprotease TMPRSS2 in den Vektor pET24(b) kloniert, der auch für die Expression der anderen Proteasen verwendet wurde. In Analogie zur Matriptase wurde ein Protein exprimiert, das am N-Terminus die Aminosäuresequenz Met-Lys-(His)₆ besitzt, wodurch eine Reinigung mittels Affinitätschromatographie möglich wird. Für die Rückfaltung wurde die von der Herstellung der Matriptase bekannten Bedingungen verwendet, wobei in den Renaturierungspuffer zusätzlich Brij 58 zugegeben wurde. Nach Abspaltung der N-terminalen Octapeptidsequenz wurde proteolytisch aktive TMPRSS2 erhalten. Auf Grund der geringen Menge war eine finale gelchromatographische Reinigung nicht möglich. Die erhaltene Präparation konnte jedoch für alle weiteren enzymkinetischen Untersuchungen eingesetzt werden.

5.4 Substrate der TMPRSS2

Bisher wurden nur zwei fluorogene Substrate der TMPRSS2 beschrieben, jedoch sind deren K_m - und k_{cat} -Werte unbekannt. Zunächst wurden 16 verschiedene chromogene pNA-Substrate geprüft. In dieser Reihe zeigte sich, dass die beiden Substrate H-D-Cha-Gly-Arg-pNA (1) und H-D-Hht-Gly-Arg-pNA (2) am besten gespalten werden. Diese

besitzen beide eine N-terminale ungeschützte P3-Aminosäure und Glycin in P2-Position.

Auf Grund der geringen Menge an aktiver TMPRSS2 wurden zusätzlich fluorogene AMC-Substrate untersucht, die Messungen bei deutlich niedrigeren Enzymkonzentrationen gestatten. Die höchsten V_{\max}/K_m -Werte aus dieser Serie wurden für das Substrat H-D-Cha-Pro-Arg-AMC (**17**) bestimmt, das auch für die weiteren Messungen mit den synthetischen Inhibitoren verwendet wurde.

5.5 Inhibitoren der TMPRSS2

Aus der Literatur waren bisher keine wirksamen synthetischen Inhibitoren der TMPRSS2 bekannt. Deshalb wurde mit der aktiven Enzympräparation ein Inhibitorscreening durchgeführt. In einer ersten Serie wurden substratanaloge Hemmstoffe mit einem C-terminalen 4-Amidinobenzylamid geprüft, die auch als Inhibitoren vieler anderer trypsinartiger Serinproteasen bekannt sind.

Zunächst wurde der Einfluss verschiedener D-konfigurierter Aminosäuren in P3-Position untersucht, wobei in P2-Position Prolin als konstanter Rest verwendet wurde. Dabei hat sich herausgestellt, dass in P3-Position besonders basische oder hydrophobe Aminosäurereste geeignet sind. Für die wirksamsten Verbindungen mit einem D-Arg, D-Asp(OtBu), D-Lys und D-homoArg wurden K_i -Werte um 20 nM bestimmt. Im Gegensatz dazu führte die Verwendung der kleinen, neutralen Aminosäuren Gly und D-Ala, sowie des sauren D-Aspartylrestes in dieser Position zu wenig wirksamen Inhibitoren mit Hemmkonstanten $> 1 \mu\text{M}$.

Substratanaloge Hemmstoffe mit Prolin in P2-Position besitzen häufig eine geringe Selektivität. Daher wurden in einer zweiten Serie Verbindungen untersucht, bei denen das P2-Prolin durch andere Aminosäuren ersetzt ist, wobei in diesem Fall D-Arg in P3-Position beibehalten wurde. Es zeigte sich, dass sowohl der Einbau von Ala ($K_i = 18 \text{ nM}$) oder von Arg ($K_i = 25 \text{ nM}$) akzeptiert wird und zu ähnlich aktiven Verbindungen führt. Alle anderen Derivate dieser Serie sind jedoch schwächer wirksam als die Ausgangsverbindung und besitzen K_i -Werte $> 50 \text{ nM}$.

Alle Verbindungen der dritten Serie, bei denen die Seitenketten von D-Asp und D-Glu in P3-Position mit zyklischen Aminen modifiziert wurden, sind mit K_i -Werten ≥ 45 nM weniger wirksam im Vergleich zu ihren Ausgangsverbindungen.

Von vielen trypsinartigen Serinproteasen ist bekannt, dass sie einen Benzylsulfonylrest in P4-Position substratanaloger Strukturen bevorzugen. Auch im Falle der TMPRSS2 trifft dies zu. Dennoch konnte innerhalb einer Serie ohne P4 Benzylsulfonylgruppe die wirksamste Hemmung für Verbindung **66** mit einem D-homoTyr in P3-Position mit einem K_i -Wert von 20 nM bestimmt werden.

Der Austausch des 4-Amidinobenzylamids in P1-Position gegen chloresubstituierte Benzylamide führt zu einer schlechteren Hemmung der TMPRSS2, obwohl dieser P1-Anker bei manchen verwandten Serinproteasen wie Thrombin oder Faktor Xa zu einer gesteigerten Affinität der Inhibitoren beiträgt.

Neben den substratanalogen Verbindungen wurde die Hemmung der TMPRSS2 durch einen weiteren Inhibitortyp untersucht, den sulfonylierten Amiden des 3-Amidinophenylalanins. Dabei wurden initial Inhibitoren mit nur einer oder zwei basischen Gruppen geprüft. Diese Hemmstoffe besitzen ungeladene und unterschiedlich substituierte Harnstoffstrukturen am C-Terminus und eine N-terminale Phenyl-3-sulfonyl-Gruppe, die mit einem β -Alanylamid substituiert ist. Die wirksamsten Analoga dieser Serie hemmen TMPRSS2 mit K_i -Werten < 20 nM.

Zusätzlich wurden 3-Amidinophenylalanin-Derivate untersucht, die substituierte biphenyl-3-sulfonyl-Gruppen am N-Terminus besitzen. Diese Verbindungen enthalten zwei unterschiedliche Piperidide am C-Terminus, wobei die basischen Aminoethylpiperidide etwa 3-6fach stärker wirksam sind als die Inhibitoren mit ungeladenen Piperidid-Resten. Innerhalb dieser Serie wurden zwei Verbindungen (**92** und **94**) identifiziert, die TMPRSS2 mit K_i -Werten um 1 nM hemmen.

Abschließend wurden weitere 3-Amidinophenylalanin-Derivate untersucht, an die bevorzugte Harnstoff-substituierte Piperidide und besonders geeignete biphenyl-3-sulfonyl-Reste gekoppelt sind. Die stärkste Hemmwirkung wurde für die beiden monobasischen Cyclohexylharnstoff-Derivate (**113** und **114**) mit K_i -Werten ≤ 5 nM bestimmt.

5.6 Neue fluorogene Substrate

Auf Grund der effektiven Hemmung der TMPRSS2 durch substratanaloge Inhibitoren mit basischen Resten in D-Konfiguration in P3-Position wurden neue fluorogene AMC-Substrate mit D-Arginin synthetisiert, als P2-Reste wurden Prolin oder Glycin eingebaut.

Die besten Substrate besitzen eine Methylsulfonylgruppe in P4-Position, wobei nur geringe Unterschiede durch den Einbau von Pro oder Gly in P2-Position resultieren. Diese Substrate besitzen ca. 60-fach gesteigerte V_{\max}/K_m Werte im Vergleich zur Ausgangsverbindung. Für alle neuen AMC-Substrate wurden relativ niedrige K_m - und meist auch höhere V_{\max} -Werte im Vergleich zur Ausgangsverbindung H-D-Cha-Pro-Arg-AMC (**17**) bestimmt.

6 Experimenteller Teil

6.1 Biochemische Methoden

Alle in diesem Abschnitt beschriebenen Methoden wurden analog etablierten Standardmethoden durchgeführt [132-135]. Bei kommerziell erhältlichen Reagenzien wurde das Standardprotokoll des Herstellers verwendet, eine Übersicht ist im Anhang angegeben (s. Tabelle A.3.-A.6).

6.1.1 Materialien für die biochemischen Methoden

6.1.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien sind in alphabetischer Reihenfolge in Tabelle 6.1 aufgeführt.

Tabelle 6.1. Chemikalienliste in alphabetischer Reihenfolge.

Name	Hersteller
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich
Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0,8%)	Roth
Agar-Agar	Roth
Agarose	Fluka
L-Arginin	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth
Bovine Serum Albumin (BSA)	Roth
Bromphenolblau	Merck
Brij 58	Sigma Aldrich
Calciumchlorid	Roth
Chloramphenicol	Roth

Coomassie Brilliant Blau R250	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
Essigsäure 100%	Roth
Ethanol 96%	Riedel-deHaën
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Glutathion	Sigma Aldrich
Glycerol 100%	Merck
Guanidin · HCl	Sigma Aldrich
Harnstoff p.a.	Roth
Hefeextrakt	Roth
Imidazol	Roth
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth
Kanamycinsulfat	Roth
Lysozym	Merck
Mercaptoethanol	Merck
Methanol	Fischer Scientific
Natriumchlorid	Roth
Natriumdodecylsulfat	Riedel-deHaën
Natriumhydroxid	Fluka
Nickelsulfat	Roth
Pepton aus Casein	Roth
Rotiphorese Gel 30	Roth
Salzsäure 37%	Riedel-deHaën
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth

6.1.1.2 Geräte

In Tabelle 6.2 sind die Geräte aufgeführt, die im Rahmen des biochemischen Arbeitens verwendet wurden.

Tabelle 6.2. Verwendete Geräte und ihre herstellende Firma.

Gerät	Hersteller
ÄKTA FPLC	Amersham Pharmacia Biosciences
Feinwaage Type 404/13	Sauter
Heizrührer IKA-COMBIMAG REG	Janke&Kunkel
PCR Mini Cycler	MJ Reasarch
pH-Meter 744	Metrohm
Ni-NTA XK 16	Amersham Biosciences
Ni-Sepharose Säule 1 ml/ 5 ml	Qiagen
Pipetten	Eppendorf
Schüttelinkubator Innova 4200	New Brunswick Scientific
Schüttelinkubator Innova 4300	New Brunswick Scientific
SDS-Gelelektrophoresekammer Mini-V8*10	Life Technology
Sterilbank 8511	Köttermann
Thermomixer comfort 2 ml	Eppendorf
Ultraschall Sonifier 250	Branson
Vakuumpumpe DANN mini	Jouan Nordic
Vortexer VF2	Janke&Kunkel
Waage Typ 572/45	Kern
Zentrifuge Avanti J-25	Beckmann Coulter
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus
Zentrifuge Multifuge 3	Heraeus

6.1.1.3 Lösungen und Puffer

In Tabelle 6.3 sind die verwendeten Lösungen und Puffer aufgeführt. Soweit nicht anders vermerkt, wurde beim Herstellen der Lösungen und Puffer Reinstwasser verwendet und der pH-Wert mittels 0,1 M NaOH oder 37 %iger Salzsäure eingestellt.

Tabelle 6.3. Puffer und Lösungen.

Name	Bestandteile
10 % SDS-Lsg.	10 % (w/v) SDS
Agar-LB-Medium	1,0 % (w/v) Pepton aus Casein 1,0 % (w/v) NaCl 0,5 % (w/v) Hefe 1,5 % (w/v) Agar-Agar ad 1000 mL bidest. H ₂ O autoklaviert
Aktivierungspuffer	50 mM Tris 1 M NaCl 0,05 % Brij 58 pH 7,5
Anodenpuffer I	0,3 M Tris 20 % (v/v) Ethanol pH 9,0
Anodenpuffer II	25 mM Tris 20 % (v/v) Ethanol pH 7,4
APS-Lsg.	10 % (w/v) Ammoniumpersulfat ad 10 mL H ₂ O
Chloramphenicol-Lsg.	0,34 g Chloramphenicol ad 10 mL Ethanol steril filtriert
Coomassie-Blau Entfärberlösung	10 % (v/v) Essigsäure 40 % (v/v) Methanol ad 1 L H ₂ O
Coomassie-Blau Färberlösung	10 % (v/v) Essigsäure 49,5 % (v/v) Methanol 1g/L Coomassie Brilliant Blau R250
Denaturierungspuffer I	6 M Guanidin · HCl 100 mM Tris 5 mM GSH pH 8,5

Denaturierungspuffer II	6 M Harnstoff 100 mM Tris 150 mM NaCl 5 mM GSH pH 8,5
Elutionspuffer I	100 mM Tris 150 mM NaCl pH 8,5
Elutionspuffer II	100 mM Tris 150 mM NaCl 50 mM Imidazol pH 8,5
Elutionspuffer II	100 mM Tris 150 mM NaCl 200 mM Imidazol pH 8,5
<i>Inclusion body</i> -Puffer	50 mM Tris 0,9 % (w/v) NaCl pH 7,5
IPTG-Lsg.	1 M IPTG steril filtriert
Kanamycinlsg.	0,3 g Kanamycinsulfat ad 10 ml H ₂ O steril filtriert
Kathodenpuffer	25 mM Tris 0,525 % (m/v) Aminocapronsäure 20 % (v/v) Ethanol pH 9,0
Laemmlipuffer	0,25 M Tris 2 M Glycerin 1 % (w/v) SDS pH 8,3
LB-Medium	1,0 % (w/v) Pepton aus Casein 0,5 % (w/v) Hefe 0,5 % (w/v) NaCl ad 1000 mL bidest. H ₂ O autoklaviert
Lysepuffer I	10 mM Tris 100 mM Na ₂ HPO ₄ 8 M Harnstoff pH 8,0

Lysepuffer II	10 mM Tris 100 mM Na ₂ HPO ₄ 8 M Harnstoff pH 6,3
Lysepuffer III	10 mM Tris 100 mM Na ₂ HPO ₄ 8 M Harnstoff pH 4,5
Natriumhydroxid-Lsg. PBS-Puffer	0,1 M NaOH 140 mM NaCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2,8 mM KCl 1,7 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,3
Renaturierungspuffer I	50 mM Tris 0,5 M L-Arginin · HCl 20 mM CaCl ₂ 1 mM EDTA 100 mM NaCl 0,05 % Brij 58 pH 7,5
Renaturierungspuffer II	100 mM Tris 150 mM NaCl 5 mM GSH pH 8,5
Renaturierungspuffer III	100 mM Tris 150 mM NaCl 5 mM GSSG pH 8,5
SDS-Probenpuffer, 4-fach	250 mM Tris 8 % (w/v) SDS 40 % (v/v) Glycerol 0,04 % (w/v) Bromphenolblau 8 % (v/v) Mercaptoethanol pH 6,8
SDS-Sammelgel-Puffer	1 M Tris, pH 6,8
SDS-Trenngel-Puffer	1 M Tris, pH 8,8
TAE-Puffer, 50-fach	2 M Tris 50 mM EDTA pH 7,8; eingestellt mit Essigsäure
Tris-Puffer	50 mM Tris HCl 154 mM NaCl pH 7,5

6.1.1.4 Primer, Plasmide und Bakterienstämme

In Tabelle 6.4 und Tabelle 6.5 sind die verwendeten *E.coli*-Bakterienstämme und Primer aufgeführt.

Tabelle 6.4. Verwendete *E.coli*-Bakterienstämme.

Stamm	Beschreibung	Hersteller
XL2-blue	<i>endA1 supE44 thi-1 hsdR17 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZAM15 Tn10</i> (Tetr) Amy Camr]	Stratagene
BL21 Gold(DE3)	B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal λ</i> (DE3) <i>endA</i> Hte	Stratagene
BL21 CodonPlus(DE3)-RIL	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal λ</i> (DE3) <i>endA</i> Hte [<i>argU ileY leuW</i> Cam ^R]	Stratagene

Tabelle 6.5. Verwendete Primer.

Name	Sequenz (5' → 3')
TMPRSS2 _f NdeI	GGATATCATATGAAACATCACCATCACCATCACATCGTGGGCGGT GAGAG
TMPRSS2 _r EcoRI	GGATATGAATTCTTAGCCGTTTGCCTTCATTTG
TMPRSS2 122_f	CTAGTGAAACCAGTGTCTCTGCCCAACCC
TMPRSS2 122_r	GGGTGGGCAGAGACACTGGTTTCACTAG
TMPRSS2 136_f	GAACAGCTCTCCTGGATTTCGG
TMPRSS2 136_r	CGGAAATCCAGGAGAGCTGTTC
HAT_f NdeI	GATATCATATGAAACATCACCATCACCATCACATCCTTGGAGGCA CTGAG
HAT_r EcoRI	GGTATAGAATTCCTAGATCCCAGTTTGTTGCC

6.1.2 DNA-Methoden

6.1.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaktion*, PCR) wurde in einem Thermocycler mit spezifischen Primern (Tabelle 6.5) nach einem Standardprotokoll durchgeführt. Der allgemeine PCR-Ansatz ist in Tabelle 6.6 dargestellt.

Tabelle 6.6. Allgemeiner PCR-Ansatz.

Volumen (µL)	Reagenz	Konzentration (ng/µL)
10	HiFi-Puffer	
1,0	Phusion Polymerase	2 U/µL
2,0	DNA-Templat	10 ng/µL
1,0	Primer 1	100 ng/µL
1,0	Primer 2	100 ng/µL
1,0	dNTP Mix	25 ng/µL
34	Wasser, autoklaviert	
50	Gesamtvolumen	

Es wurden 25 Wiederholungen eines Zyklus des allgemeinen PCR-Protokolls (Tabelle 6.7) durchgeführt.

Tabelle 6.7. Allgemeines PCR-Protokoll.

	Zeit (min)	Temperatur (°C)	Beschreibung
1.	0,5	95	Initialisierung
2.	0,5	95	Denaturierung
3.	1,0	60	Annealing
4.	2,0	68	Elongation

Die PCR-Produkte wurden mittels einer Standard Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert (s. Abschnitt 6.1.2.10) analysiert und bei 4 °C gelagert.

6.1.2.2 Reinigung der PCR-Produkte

Für die notwendige Reinigung der PCR-Produkte wurde das Gel-Extraktions-Kit (peQ-Lab, Erlangen, Deutschland) eingesetzt. Dabei wurden 50 µL des PCR-Ansatzes mit 300 µL des Bindepuffers versetzt, auf die peQ-Lab Säule aufgetragen und für eine Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die auf der Säule gebundene DNA wurde zweimal mit je 600 µL CG-Wasch-Puffer versetzt und bei 10.000 rpm eine Minute zentrifugiert. Die DNA-Fragmente wurden zweimal mit je 32 µL Wasser bei 7.000 rpm für eine Minute von der Säule eluiert.

6.1.2.3 Restriktion

Um einheitliche DNA-Fragmente zu erhalten, wurden die PCR-Produkte mit Restriktionsenzymen inkubiert. Zum Einbau der gereinigten DNA-Fragmente wurden die Plasmide mit den gleichen Restriktionsenzymen geöffnet.

Bei der Restriktion wurden die PCR-Fragmente mit den Restriktions-Enzymen NdeI und EcoRI für 36 Stunden bei 37 °C inkubiert. Der allgemeine Restriktionsansatz ist in Tabelle 6.8 dargestellt.

Tabelle 6.8. Allgemeiner Ansatz zum Verdau der PCR-Fragmente mit Restriktionsenzymen.

Volumen (µL)	Reagenz
2	Puffer O (10-fach)
2	BSA (10-fach)
1	Restriktionsenzym 1
1	Restriktionsenzym 2
14	PCR-Produkt oder Plasmid
20	Gesamtvolumen

Für die nachfolgende Agarose-Gelelektrophorese (s. Abschnitt 6.1.2.10) und anschließende Gelextraktion (s. Abschnitt 6.1.2.4) wurde der Restriktionsansatz bei 7.000 rpm eine Minute zentrifugiert.

6.1.2.4 Gelextraktion

Nach erfolgreicher PCR und Restriktion wurde das Plasmid mittels Agarose-Gelelektrophorese für die weitere Verwendung gereinigt. Die DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und die gewünschte Bande mit Hilfe eines Skalpells aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA wurde anschließend unter Verwendung des Gel-Extraktions-Kits (peQ-Lab) aus dem Gel herausgelöst und gereinigt. Hierfür wurde das Agarose-Gel-Stück mit 300 µL Bindepuffer versetzt und das Gel für 10 Minuten bei 50 °C und 300 rpm im Thermomixer aufgelöst. Die entstandene gelbliche Lösung wurde auf eine peQ-Säule aufgetragen und bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die an der Säule gebundene DNA wurde je zweimal mit 600 µL CG-Wasch-Puffer versetzt und bei 10.000 rpm für eine Minute gewaschen. Zum Schluss wurde die Säule bei 13.000 rpm für eine Minute getrocknet und die gewünschte DNA zweimal mit jeweils 32 µL Wasser bei 7.000 rpm für eine Minute eluiert.

6.1.2.5 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die spezifische Absorption der DNA bei 260 nm wurde mit Hilfe eines UV-Vis-Spektrometers bestimmt und daraus die Konzentration nach Gleichung 1 berechnet, wobei das jeweilige Lösungsmittel als Referenzwert diente. Um zu gewährleisten, dass die gemessenen Absorptionen im empfohlenen Bereich von 0,4 – 0,7 liegt, wurde die Probe entsprechend verdünnt.

$$c(DNA) = 50 \frac{ng}{mL} \cdot Absorption \cdot Verdünnungsfaktor \quad (1)$$

6.1.2.6 Ligation

Bei der Ligation wurde das DNA-Fragment mit Hilfe der T4-DNA-Ligase in das ringförmige Plasmid eingebaut, wobei das DNA-Fragment im Verhältnis 1:4 (Plasmid:DNA-Fragment) eingesetzt wird. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur. Der allgemeine Ansatz für die Ligation ist in Tabelle 6.9 dargestellt.

Tabelle 6.9. allgemeiner Ansatz zur Ligation von DNA-Fragment und Plasmid.

Volumen (µL)	Reagenz
1	Plasmid
4	PCR-Fragment
2	Ligase-Puffer
1	T4-DNA-Ligase
2	Wasser
10	Gesamtvolumen

6.1.2.7 Plasmid-Transformation

Die Plasmide wurden mittels Hitze-Schock-Verfahren in die jeweiligen Bakterienstämme transformiert. Dafür wurden 50 µL Bakterienstammlösung kompetenter Zellen mit 5 µL Plasmid 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 40 Sekunden auf 42 °C im Heizblock erhitzt. Nach weiterer Inkubation für 10 Minuten auf Eis wurde 1 mL LB-Medium zugegeben und die Zellen für 45 Minuten bei 37 °C zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz inkubiert. Zum Schluss wurden die Zellen mittels Zentrifugation bei 13.000 rpm geerntet, auf einer mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzten Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die entstandenen Kolonien wurden in einer Übernachtskultur angezüchtet, mittels einer Minipräparation (s. Abschnitt 6.1.2.8) das Plasmid gereinigt, mit den entsprechenden Restriktionsenzymen inkubiert und mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

6.1.2.8 Plasmid-Minipräparation

Die Gewinnung der DNA-Plasmide erfolgte nach einem Standardprotokoll mit dem Plasmid Miniprep Kit I der Firma peQ-Lab. Hierfür wurden 4 mL einer Übernachtskultur bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, das entstandene Zellpellet in 500 µL Lösung I resuspendiert, 500 µL Lösung II zugegeben, der komplette Ansatz invertiert und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 750 µL der Lösung III zugesetzt und der entstandene Niederschlag für 10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde danach auf eine peQ-Säule aufgetragen und erneut bei 6.000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde einmal mit 500 µL HB-Puffer und zweimal mit 750 µL DNA-Waschlösung gewaschen und bei 13.000 rpm für eine Minute getrocknet. Das Plasmid wurde in zwei Schritten mit jeweils 32 µL bi-distilliertem Wasser bei 7.000 rpm für eine Minute eluiert.

6.1.2.9 Übernachtskultur

Unter einer Sterilbank wurden zu 10 mL LB-Medium Kanamycin (finale Konzentration 30 µg/mL) und gegebenenfalls zusätzlich Chloramphenicol (35 µg/mL) zugegeben und mit einem *E. coli* Stamm angeimpft. Die Kultur wurde anschließend bei 37 °C und 220 rpm für mindestens 16 Stunden im Schüttelinkubator angezogen.

6.1.2.10 Agarose-Gelelektrophorese

0,4 – 0,5 g Agarose wurden in 50 mL TAE-Puffer unter Erwärmen gelöst und mit 5 µL des Farbstoffs Sybr Safe 10000x (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) versetzt, um die zu untersuchenden DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar zu machen. Nach dem Aushärten des Gels in einer Agarosegelkammer wurde diese mit TAE-Puffer befüllt, wobei die Geltaschen durch einen Kamm geformt wurden, der schon in die noch flüssige Lösung eingebracht wurde. Anschließend wurden 10 µL der DNA-Probe mit 2 µL Farbstoff versetzt und in den Geltaschen auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurde bei jeder Elektrophorese ein Marker mit definierten Größenstandards (s. Tabelle A.5), ebenfalls mit Farbstoff versetzt, zur Kontrolle auf das Gel aufgetragen. Die Entwicklung der Elektrophorese erfolgte bei 100 V für 45 Minuten. Am Ende wurden die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

6.1.2.11 Mutagenese mittels PCR

Eine Mutation in ein Gen wurde durch Basenaustausch in den verwendeten Primer bei der PCR eingeführt, wobei der Primer so gewählt wurde, dass die Basensequenzen rechts und links der Mutationsstelle die gleiche Schmelztemperatur besitzen. Die Mutagenese erfolgte mit einer üblichen PCR (s. Abschnitt 6.1.2.1), wobei die Ansatzgröße und Replikationszeiten beibehalten wurden.

6.1.2.12 *DpnI*-Verdau

Nach Mutagenese oder PCR mit Plasmiden, die aus *E. coli* Stämmen mittels Plasmid-Minipräparation gewonnen wurden, ist es notwendig das nicht veränderte Ausgangsplasmid mit Hilfe der DNase *DpnI* zu verdauen. Diese spezielle DNase benötigt in ihrer Substraterkennung eine methylierte Guaninbase, die in bakteriellen Zellen entsteht. Plasmide, die durch eine PCR entstanden sind, tragen keine Modifikation am Guanin und sind somit kein Substrat der *DpnI*.

6.1.2.13 Sequenzierung

Zur Analyse der Replikation oder Mutagenese wurden jeweils 1 µg Plasmid bei der Firma MWG Biotech (Martinsried, Deutschland) sequenziert.

6.1.2.14 Glycerolstammsuspension

Nach erfolgreicher Replikation oder Mutagenese, die durch Sequenzierung bestätigt wurde, wurden 750 µL der Übernachtskultur mit dem entsprechenden Klon zu 250 µL sterilem Glycerol gegeben und bei -80 °C gelagert.

6.1.3 Protein-Methoden

6.1.3.1 Expression

Zur Überexpression eines *E. coli* Stamms wurde das hundertfache Volumen LB-Medium mit einer Übernachtskultur angeimpft, wobei dem Medium zuvor Kanamycin und gegebenenfalls Chlaramphenicol zu einer finalen Konzentration von 30 µg/mL bzw. 32 µg/mL zugegeben wurde. Das Medium wurde anschließend im Schüttelinkubator bei 37 °C und 220 rpm für etwa drei Stunden inkubiert. Das Wachstum der Zellen wurde durch Absorptionsmessung bei 600 nm kontrolliert. Dafür wurde 1 mL Probe im UV-Vis-Spektrometer vermessen, wobei reines LB-Medium als Referenz verwendet wurde. Bei einer Absorption von 0,8 – 1 wurde die Expression durch Zugabe von 1M IPTG-Lösung (finale Konzentration von 1 mM im Ansatz) induziert. Anschließend wurde die Kultur drei Stunden bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Zum Schluss wurde das Medium durch Zentrifugation bei 6.000 rpm entfernt, das entstande Zellpellet aus 1 L Medium in 40 mL *inclusion body*-Puffer resuspendiert und bei -20 °C über Nacht gelagert.

Zur Kontrolle der Expression wurde sowohl vor als auch nach der Zugabe der IPTG-Lösung 1 mL Probe aus der Kultur entnommen, bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet mit 30 µL SDS-Probenpuffer versetzt und mit SDS-Gelelektrophorese analysiert.

6.1.3.2 Zell-Lyse

Zu den resuspendierten Zellen des Vortags wurde 3 mM DTT als Antioxidans hinzugefügt. Die Zellen wurden mit Ultraschall aufgeschlossen, dabei wurde die Suspension zehnmal eine Minute lang bei einer Stärke von 3,5/10 bei 70 % Output auf Eis behandelt. Zum Abbau vorhandener DNA wurde die Suspension mit Benzonase (Qiagen, Hilden, Deutschland) versetzt und eine halbe Stunde auf Eis inkubiert.

Um die unlöslichen von den löslichen Rückständen zu trennen, wurde die Suspension anschließend bei 20.000 rpm für 30 Minuten zentrifugiert. Da die Expression der

gewünschten Proteine zu unlöslichen *inclusion bodies* führt, wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet zur weiteren Bearbeitung verwendet.

Zur Kontrolle der Expression mittels SDS-Gelelektrophorese wurde von der Suspension der aufgeschlossenen Zellen eine 50 µL Probe entnommen und bei 13000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Vom Überstand wurden 20 µL mit 20 µL SDS-Probenpuffer versetzt und der Rest verworfen. Das Zellpellet wurde ebenfalls mit 50 µL SDS-Probenpuffer versetzt.

6.1.3.3 Denaturierung und Reinigung über einen His-Tag

Da die Expression der gewünschten Proteine in Form von *inclusion bodies* stattfindet, war es notwendig die Proteine vor ihrer Aufreinigung zu denaturieren und sie damit in eine „lösliche“ Form zu bringen. Zur Denaturierung wurde das Zellpellet aus 1 L LB-Medium und anschließender Zelllyse in 30 mL Lysepuffer I pH 8,0 resuspendiert und Mercaptoethanol zu einer finalen Konzentration von 10 mM als Antioxidans hinzugefügt. Der Ansatz wurde für drei Stunden auf Eis inkubiert und anschließend bei 20.000 rpm 20 Minuten zentrifugiert. Die unlöslichen Bestandteile wurden verworfen und der Überstand mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Hierfür wurde der Überstand mit einer Flussrate von 1 ml/min auf eine 5 mL Ni-NTA-Säule der Firma Qiagen mit einem Äkta-System der Firma GE Healthcare (Freiburg, Deutschland) aufgetragen, die zuvor mit Lysepuffer I pH 8,0 äquilibriert wurde. Anschließend wurde die Säule mit dem jeweils 10-fachen Säulenvolumen mit Lysepuffer I pH 8,0 und anschließend mit Lysepuffer II pH 6,3 bei einer Flussrate von 1 ml/min gespült. Das Protein wurde mittels Lysepuffer III bei pH 4,5 eluiert. Bei diesem pH-Wert liegen die 6 Histidine des His-Tags in protonierter Form vor und binden nicht mehr an das positiv geladene Nickel-Ion. Die Protein-enthaltenen Fraktionen wurden vereint.

6.1.3.4 Renaturierung des Proteins mittels *rapid dilution* Methode

Zum Rückfalten wurde die von der Ni-NTA-Säule eluierte Proteinlösung mit einer Flussrate von 0,1 mL/min in das 50-100fache Volumen des Renaturierungspuffers I getropft. Der Rückfaltungspuffer wurde vorher auf Eis gekühlt. Anschließend wurde der Renaturierungs-Ansatz für drei Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Die rückgefaltete Proteinlösung wurde mittels einer Tangentialmembran Vivaflow 200 (Novagen, Darmstadt, Deutschland) auf ein Volumen von etwa 50 mL aufkonzentriert.

6.1.3.5 Denaturierung, Reinigung und Renaturierung mittels einer Ni-NTA Säule

Bei dieser Methode erfolgten die Reinigung und die Rückfaltung des Proteins simultan über eine Affinitätschromatographie. Hierfür wurden die zuvor erhaltenen *inclusion bodies* im Denaturierungspuffer I mit 5 mM Mercaptoethanol vollständig denaturiert. Anschließend wurde das Säulenmaterial einer 20 mL Ni-NTA Säule mit diesem Puffer equilibriert, die gelösten *inclusion bodies* auf die Säule aufgetragen und 1,5 Stunden über Kopf geschüttelt, sodass eine gleichmäßige Verteilung des Proteins auf der Säule erreicht wurde. Nach Absetzen des Säulenmaterials wurde die Säule frei von Luftblasen verschlossen und die Rückfaltung gestartet. Dazu wurde die Säule mit zehn Säulenvolumen des Denaturierungspuffers II umgepuffert, wodurch unspezifisch gebundene Proteine eluiert wurden. Zur Rückfaltung des Proteins wurde mittels Gradienten von 35 Säulenvolumen bei einer Flussrate von 1mL/min über Nacht bei 4 °C von 0 auf 100 % Renaturierungspuffer II umgepuffert. Zur Ausbildung der korrekten Disulfidbrücken wurde mittels eines Gradienten von 10 Säulenvolumen bei 4 °C von Renaturierungspuffer II auf 100 % Renaturierungspuffer III gewechselt (Flussrate 2,5 mL/min). Danach wurde mit zwei Säulenvolumen Elutionspuffer I gewaschen, um das GSSG zu entfernen. Anschließend wurde mit zwei Säulenvolumen Elutionspuffer II (enthält 50 mM Imidazol) gespült, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Die finale Elution des Proteins erfolgte mit dem Elutionspuffer III (zwei Säulenvolumen, enthält 200 mM Imidazol).

6.1.3.6 Aktivierung des Proteins durch Abspaltung des His-Tags

Typsinartige Serinproteasen werden durch Spaltung vor dem Rest 16 aktiviert. Die notwendige Abspaltung der Sequenz Met-Lys-(His)₆ vor dem Rest 16 erfolgte durch Inkubation mit der Dipeptidylpeptidase DAPase (Qiagen), wobei es sich um ein mit einem His-Tag modifiziertes Cathepsin C handelt [96]. 2,5 mL der rückgefalteten und aufkonzentrierten Proteinlösung wurden mittels Schwerkraft auf PD10-Säulen (GE Healthcare) aufgetragen und anschließend mit 3,5 mL Aktivierungspuffer nach Standardprotokoll umgepuffert. Anschließend wurde die umgepufferte Proteinlösung bei Raumtemperatur nach Standardprotokoll des Herstellers mit DAPase aktiviert. Das empfohlene Verhältnis von DAPase und Proteinlösung ist in Tabelle 6.10 angegeben.

Tabelle 6.10. Verhältnis Zielprotein und benötigte DAPase im Aktivierungsansatz nach Standardprotokoll.

Masse Protein	Menge DAPase (c = 20 U/mL)	Volumen DAPase (µL)
50 µg	2,5 mU	0,125
1 mg	50 mU	2,5

6.1.3.7 Präparative Größenausschlusschromatographie

Das durch die Abspaltung des His-Tags aktivierte Protein wurde durch Zentrifugalfiltration mit Vivaspin 20 10.000 (Satorius, Göttingen, Deutschland) bis auf ein Volumen von 10 mL aufkonzentriert. Diese Proteinlösung wurde mit einem Äkta Prime System auf eine HiLoadTM Säule (26/60 SuperdexTM 75 prep grad, Amercham Bioscience, Freiburg, Deutschland) mit einer Flussrate von 4 mL/min aufgetragen. Die Elution erfolgt mit dem gleichen Puffer. Von den gesammelten Fraktionen wurde jeweils eine Probe von 50 µL entnommen und in einem Ansatz mit 20 µL des chromogenen Substrats (c = 2 mM) H-D-Cha-Gly-Arg-pNA überführt. Die Fraktionen mit aktivem Enzym bewirkten eine Gelbfärbung im Testansatz.

6.1.3.8 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Der Erfolg einer Proteinexpression, Zelllyse oder Reinigung wurde mit Hilfe einer SDS-PAGE geprüft. Die Zusammensetzung der verwendeten Sammel- und Trenngele ist in Tabelle 6.11 bzw. Tabelle 6.12 aufgeführt.

Tabelle 6.11. Allgemeine Zusammensetzung eines Sammelgels.

Volumen (mL)	Reagenz
0,500	Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0,8%)
1,870	Wasser
0,600	Sammelgelpuffer
0,030	10 %-ige SDS-Lösung
0,030	APS
0,003	TEMED

Tabelle 6.12. Allgemeine Zusammensetzung eines Trenngels.

Volumen (mL)	Reagenz
1,500	Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0,8%)
0,470	Wasser
1,000	Trenngelpuffer
0,030	10 %-ige SDS-Lösung
0,030	APS
0,003	TEMED

Die zur Analyse entnommenen Proteinproben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95 °C im Heizblock denaturiert. Das Gel wurde in eine entsprechende Kammer gestellt, die mit Laemmli-Puffer befüllt wurde. Anschließend wurden die Proben und die Molekulargewichtsmarker (s Tabelle A.5) aufgetragen. Die Proteintrennung wurde bei 130 V für etwa 2,5 Stunden durchgeführt.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Trenngel vom Sammelgel getrennt und das Trenngel für mindestens 5 Stunden bei Raumtemperatur mit Coomassie-Blue Färbelösung behandelt. Danach wurde das Gel mit Entfärbelösung entfärbt, wobei die Proteinbanden gefärbt blieben, da sich der verwendete Farbstoff an basische und aromatische Aminosäuren anlagert.

6.1.3.9 Western Blot

Bei dieser Methode werden Proteine, die zuvor mit Elektrophorese aufgetrennt wurden, auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) übertragen und anschließend mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Zunächst wurden je drei Filterpapiere für etwa 10 Minuten in Anoden I-, Anoden II- und Kathoden-Puffer inkubiert. Diese Filterpapiere wurden zusammen mit einer zuvor in Methanol und Anoden II-Puffer aktivierte Membran gemäß Abbildung 6.1 in eine Western Blot-Kammer eingebracht. Die Übertragung erfolgte für eine Stunde bei 300 V und 80 mA.

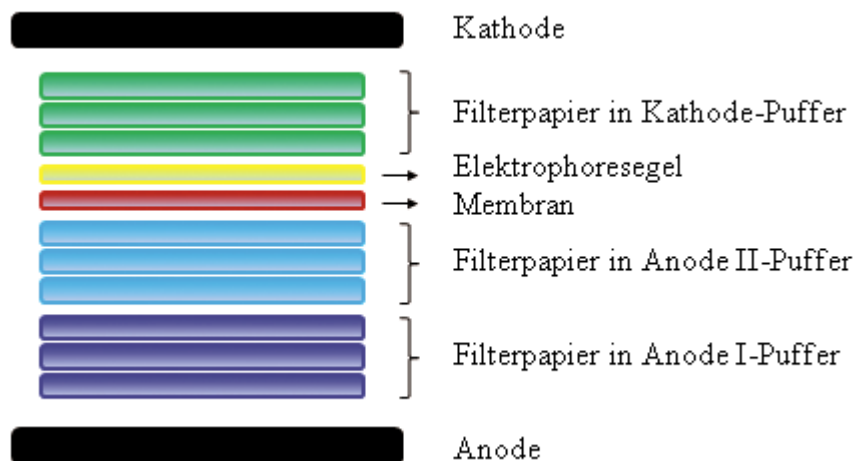


Abbildung 6.1. Schematische Darstellung des allgemeinen Aufbaus eines Western Blots.

Zum Absättigen der unspezifischen Proteinbindungsstellen auf der Membran wurde diese in 7 %-igem Milchpulver in PBS-Puffer für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4 °C in 7 %-igem

Milchpulver in PBS-Puffer mit spezifischen Antikörpern⁴ inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal kurz und anschließend dreimal für 10 Minuten mit PBS-Puffer/0,1 % Tween gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem zweiten Antikörper in 7 %-igem Milchpulver in PBS-Puffer für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und erneut, wie zuvor beschrieben, gewaschen.

Das Protein wurde mit Hilfe der verstärkten Chemolumineszenz detektiert. Dabei wird die Aktivität der an den zweiten Antikörper gekoppelten Peroxidase mit Hilfe eines geeigneten Substrats bestimmt. Dazu wurde die Membran nach Herstellerangaben mit dem Substrat Pierce ECL (*enhanced chemiluminescence*) der Firma Thermo Scientific inkubiert und die aus der Umsetzung resultierende Lichtemission durch Auflegen eines Röntgenfilms detektiert.

⁴ Die Antikörper gegen TMPRSS2 und Matriptase wurden von Dr. Eva Böttcher-Friebertshäuser (Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg) zur Verfügung gestellt.

6.2 Chemische Methoden

Alle in diesem Abschnitt beschriebenen Methoden für enzymkinetischen Untersuchungen und Synthesen sind Standardmethoden und wurden bereits vorhergehend beschrieben [87-89,100,110].

6.2.1 Materialien und Methoden

6.2.1.1 Verwendete Materialien

Alle verwendeten Lösungsmittel und Standardchemikalien wurden von den Firmen Acros, Fischer Scientific, Fluka, Merck, Roth, Sigma-Aldrich oder VWR bezogen. Das Acetonitril für die analytische oder präparative HPLC wurde von der Firma VWR (HiPerSolv CHROMANORM) gekauft. Reinstwasser für die HPLC, sowie zum Herstellen von wässrigen Lösungen von Säuren, Basen oder Salzen, wurde mit einer NOWApure select Anlage (KSN Water Technology, Niestetal) hergestellt. Trifluoressigsäure stammt aus Hochschullieferungen der Firma Solvay (Hannover, Deutschland). Aminosäuren und deren Derivate wurden von den Firmen Bachem, IRIS Biotech, Novabiochem oder Pentapharm bezogen.

6.2.1.2 HPLC

Für alle analytischen und präparative RP-HPLC-Messungen wurde als Fließmittel A Reinstwasser mit 0,1 % TFA und als Fließmittel B Acetonitril mit 0,1 % TFA verwendet. Zur Charakterisierung der Verbindungen wird die Acetonitrilkonzentration, bei der das betreffende Derivat eluiert, als % B angegeben. Die Reinheit der Substrate und ihrer Intermediate basiert auf der Detektion bei 220 nm.

HPLC 1:

Sämtliche analytischen Messungen wurden mit einer HPLC-Anlage LC-10A der Firma Shimadzu, die aus den Teilsystemen CTO-10A Säulenofen, zwei LC-10A TvP-Pumpen, DGU-14A Degasser, SCL-10AvP System Controller, SPD-M10AvP Dioden-Array-

Detektor und einem SIL-10Axl Autoinjektor besteht, mit einer Nucleodur-Säule (100-5 C₁₈ ec, 300 Å 5 µM, 250 × 4,6 mm, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) durchgeführt, wobei die Flussrate 1 mL/min betrug. Die Trennungen erfolgten mit einem linearen Gradienten, bei dem die Konzentration des Fließmittels B um 1 % je Minute erhöht wurde. Entsprechend der Hydrophobizität der Verbindungen wurden verschiedene Startbedingungen bei 1, 10, 20 und 30 % B gewählt.

Präparative HPLC:

Die Reinigung der Endverbindungen und einiger Intermediate erfolgte mittels einer Varian HPLC-Anlage, die aus zwei PrepStar-Pumpen Modell 218, einem ProStar Detektor Modell 320 und einem Fraktionskollektor Modell 701 und einer Nucleosil-Säule (300-5 C₁₈, 300 Å, 5 µM, 250 × 32 mm, Macherey-Nagel) besteht. Für alle Reinigungen wurde ein linearer Gradient (Steigerung Fließmittel B um 1% je zwei Minute) bei einer Flussrate von 20 mL/min verwendet. Die jeweiligen Startbedingungen wurden an die Hydrophobizität der Verbindungen angepasst.

6.2.1.3 Lyophilisierung

Alle Substrate und einige Intermediate wurden in 80 % *tert.*-Butanol in demineralisiertem Wasser oder in reinem demineralisierten Wasser gelöst, eingefroren und mit einer Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4 LDplus (Christ, Osterode am Harz, Deutschland) lyophilisiert.

6.2.1.4 Massenspektrometrie

Die Massenbestimmungen der synthetisierten Substrate und Intermediate wurde mit einem QTrap 2000 ESI Massenspektrometer (Applied Biosystems, USA) durchgeführt.

6.2.2 Enzymkinetische Messungen mit chromogenen *p*NA-Substraten

6.2.2.1 Allgemeines

Die Bestimmung der enzymkinetischen Parameter K_m und V_{max} für Substrate erfolgte an einem Mikroplattenleser IEMS Reader MF 1401 (Labsystems, Helsinki, Finnland) bei einer Wellenlänge von 405 nm. Die untersuchten Substrate, synthetisiert im Arbeitskreis oder käuflich erworben, wurden als 2 mM Stammlösung in 10 % DMSO und Reinstwasser gelöst. Die weiteren Verdünnungen zu den entsprechenden Konzentrationen wurden mit Reinstwasser durchgeführt. Die DMSO-Konzentration im Messansatz war in allen Fällen $< 1\%$. Sämtliche Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, der allgemeine Messansatz ist in Tabelle 6.13 dargestellt.

Tabelle 6.13. Messansatz zur Bestimmung der enzymkinetischen Parameter mit *p*NA-Substraten.

Volumen (μ L)	Reagenz
25	Substratlösung
200	Messpuffer
50	Enzymlösung in Puffer
275	Gesamtvolumen

Für die enzymkinetischen Messungen wurde die rekombinant hergestellte katalytische Domäne der trypsinartigen Serinprotease TMPRSS2 verwendet. Die Protease wurde vor der Messung in Enzymverdünnungs-Puffer (50 mM Tris, pH 8, 0,9% NaCl, 0,05% Brij 58) 1:20 verdünnt. Die Messungen wurden durch Enzymzugabe gestartet.

6.2.2.2 Screening chromogener Substrate

Beim anfänglichen Screening wurde die Spaltung der Substrate bei einer konstanten Konzentration von 200 μ M im Messansatz untersucht. Die bestimmten Spaltraten wurden in prozentualer Form verglichen, wobei die höchste Spaltrate ein Wert von 100 % zugewiesen wurde.

6.2.2.3 Bestimmung der enzymkinetischen Parameter chromogener Substrate

Die fünf vielversprechendsten Substrate des Screenings wurden weitergehend untersucht. Für jedes Substrat wurden sieben unterschiedliche Konzentrationen verwendet und die Steigung der Zeit-Umsatzkurven bestimmt. Die Messdaten wurden mittels einer Michaelis-Menten-Anpassung nach Gleichung 2 ausgewertet, wobei S die Enzymkonzentration, V_{\max} die Maximalgeschwindigkeit der ungehemmten Enzymreaktion, v die Geschwindigkeit der Enzymreaktion und K_m die Michaelis-Menten-Konstante ist.

$$v = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_m + [S]} \quad (2)$$

Die angegebenen K_m - und V_{\max} -Werte sind die Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Bestimmungen.

6.2.3 Enzymkinetische Messungen mit AMC-Substraten

6.2.3.1 Allgemeines

Die Bestimmung der Hemmkonstanten der untersuchten Verbindungen erfolgte in schwarzen FluoroNunc F96 MaxiSorp-Platten (Nunc, Langenselbold, Deutschland) an einem Fluoreszenzplattenleser Tecan Safire² (Tecan, Männedorf, Schweiz) mit einer Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$ und der Emissionswellenlänge $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur in Messpuffer (50 mM Tris, pH 8,0, 154 mM NaCl) durchgeführt. Die verwendeten Fluoreszenzsubstrate mit einem P1' 7-Amino-4-methylcoumarin, wurden im Arbeitskreis synthetisiert oder käuflich erworben. Es wurden Stammlösungen mit einer Konzentration von 2 mM hergestellt, wobei alle Substrate in Reinstwasser mit 20 % DMSO gelöst und mit Wasser zu den entsprechenden Konzentrationen wurden. Die Stammlösungen der zu untersuchenden Inhibitoren wurden mit einer Konzentration von 10 oder 100 mM in DMSO hergestellt und weiter mit DMSO verdünnt. Die verwendeten Inhibitorkonzentrationen wurden bei jeder Messung mindestens um eine Größenordnung variiert. Bei der Berechnung aller Molekulargewichte wurde für jede basische Gruppe ein Molekül TFA addiert. Die Messungen wurden durch Enzymzugabe gestartet, der allgemeine Messansatz ist in Tabelle 6.14 dargestellt.

Tabelle 6.14. Allgemeiner Messansatz zur Bestimmung der Hemmkonstanten mit AMC-Substraten.

Volumen (μL)	Reagenz
2	Inhibitor in DMSO
158*	Messpuffer
20	Substratlösung
20	Enzymlösung in Puffer
200	Gesamtvolumen

* Bei den Messungen ohne Inhibitor wurden 160 μL Messpuffer verwendet.

Die enzymkinetischen Messungen wurden mit der rekombinant hergestellten katalytischen Domäne der TMPRSS2 durchgeführt. Die Protease wurde vor der Messung mit Enzymverdünnungs-Puffer (50 mM Tris, pH 8, 0,9% NaCl, 0,05% Brij 58) 1:200 verdünnt.

Bei jeder Inhibitor-Messung wurden neben den Hemmkonstanten auch jeweils die enzymkinetischen Parameter K_m und V_{max} bestimmt.

6.2.3.2 Bestimmung der enzymkinetischen Parameter fluorogener Substrate

Aus den erhaltenen Zeit-Umsatzkurven wurden durch lineare Regression die *steady-state*-Geschwindigkeiten v bestimmt und die enzymkinetischen Parameter K_m und V_{max} mittels *Gleichung 2* berechnet. Pro Substrat wurden die Geschwindigkeiten von acht Konzentrationen bestimmt und in Abhängigkeit der Substratkonzentrationen aufgetragen. Die angegebenen K_m - und v_{max} -Werte ergeben sich aus den Mittelwerten aus mindestens zwei unabhängigen Bestimmungen.

6.2.3.3 Screening der TMPRSS2-Hemmung

Beim initialen Screening wurden die Konzentrationen der Inhibitoren von 100 μM bis 0,1 μM im Ansatz über vier Größenordnungen variiert und H-D-Cha-Pro-Arg-AMC \times 2 TFA in einer Konzentration von 100 oder 200 μM als Substrat eingesetzt. Die K_i -Werte wurden nach *Gleichung 3* berechnet, indem die Steigungen der erhaltenen Zeit-Umsatzkurven in Abhängigkeit der Inhibitorkonzentrationen aufgetragen wurden, wobei v die Geschwindigkeit der Enzymreaktion, V_{\max} die Maximalgeschwindigkeit der ungehemmten Enzymreaktion, $[S]$ die Substratkonzentration, K_m die Michaelis-Menten-Konstante, $[I]$ die Inhibitorkonzentration und K_i die Inhibitorkonstante ist.

$$v = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_m \times \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad (3)$$

6.2.3.4 Bestimmung der Hemmkonstanten der TMPRSS2-Inhibitoren

Für die Bestimmung der Hemmkonstanten wurden die *steady-state*-Geschwindigkeiten von jeweils acht Inhibitorkonzentrationen bei drei unterschiedlichen Substratkonzentrationen ermittelt. Die Inhibitorkonzentrationen wurden über mindestens eine Größenordnung variiert, wobei das Substrat mit den Konzentrationen 200, 100 und 50 μM verwendet wurde. Die K_i -Werte berechneten sich nach *Gleichung 3*, wie im Abschnitt 6.2.3.3 beschrieben. Die angegebenen K_i -Werte ergeben sich aus den Mittelwerten aus mindestens zwei unabhängigen Bestimmungen.

6.2.4 Titration der aktiven Zentren

Die Bestimmung der aktiven Enzymkonzentration erfolgte an einem Küvetten-Fluoreszenz Gerät RF-5301 (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Deutschland). Als Substrat wurde 4-Methylumbelliferyl 4-guanidinobenzoat (MUGB) der Firma Sigma-Aldrich (München, Deutschland) mit einer Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$ und der Emissionswellenlänge $\lambda_{\text{em}} = 445 \text{ nm}$ verwendet (Spaltbreiten 5 nm). Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur in Messpuffer (50 mM Tris, 154 mM NaCl, pH 8,0) durchgeführt.

Zur Berechnung der Enzymkonzentration war es erforderlich eine Kalibriergerade für das verwendete Gerät mit dem Produkt 4-Methylumbelliferon (4-Hydroxy-Methylcumarin) (Sigma) unter identischen Messbedingungen zu bestimmen. Dazu wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 2 mM in 100 % DMSO hergestellt und mit DMSO weiter auf 100 μM verdünnt. Diese Lösung wurde mit 1 mM HCl auf 1 μM verdünnt. Zur Bestimmung der Kalibriergeraden wurde die Konzentration des Substrats mittels Zugabe von Messpuffer über zwei Größenordnungen variiert, wobei vier unabhängige Einwaagen bei jeder Konzentration zweimal unabhängig vermessen wurden.

Das Substrat wurde als Stammlösung mit einer Konzentration von 10 mM in *N*-Methylpyrrolid-2-on hergestellt, die weiteren Verdünnungen erfolgten mit 1 mM HCl. Zu Beginn wurde der nichtenzymatische Zerfall des Substrats bei pH 8,0 als Referenz bestimmt. Der allgemeine Messansatz ist in Tabelle 6.15 dargestellt.

Tabelle 6.15. Allgemeiner Messansatz zur Bestimmung der Konzentration des aktiven Enzyms.

Volumen (μL)	Reagenz
20	Substrat ($c = 200 \mu\text{M}$)
960	Puffer
20	Enzymlösung oder Puffer
1000	Gesamtvolumen

Bei jeder Messung wurde die Zeitspanne zwischen der Enzymzugabe und dem Erhalt des ersten Messwerts bestimmt und bei der Auswertung berücksichtigt.

Für die Konzentrationsbestimmung des Enzyms wurde die Geradengleichung des linearen Teils der Zeit-Umsatzkurven ermittelt und auf die y-Achse extrapoliert, nachdem die Messwerte des nichtenzymatischen Zerfalls subtrahiert wurden. Mit Hilfe der Kalibriergeraden wurde aus dem sprunghaften Anstieg (*burst*) zum Zeitpunkt $t = 0$ s die Enzymkonzentration errechnet.

6.2.5 Allgemeine Synthesevorschriften

In diesem Abschnitt sind allgemeine Vorschriften angegeben, die bei den Synthesen mehrfach verwendet wurden.

Vorschrift A:

Abspaltung der Boc- oder Pbf-Schutzgruppe mit 90% TFA

1 mmol Boc- oder Pbf-geschützte Verbindung wurde in ca. 10 mL in 90 % TFA gelöst und für ca. 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der verbliebene Rest in Wasser mit 0,1% TFA gelöst, die Verbindung mittels präparativer HPLC gereinigt und das Produkt aus 80% *tert.*-Butanol lyophilisiert.

Vorschrift B:

PyBOP-Kopplung [129]

Ein Äquivalent der Aminokomponente und ein Äquivalent der Carboxylkomponente wurden in DMF gelöst und mit einem Äquivalent PyBOP, sowie zwei bis drei Äquivalenten DIPEA versetzt. Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei 0 °C und weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der pH-Wert wurde mehrfach kontrolliert und gegebenenfalls durch Zusatz von DIPEA wieder auf pH 8-9 gebracht. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, das entstandene Rohprodukt mit präparativer HPLC gereinigt und aus 80% *tert.*-Butanol lyophilisiert.

Vorschrift C:

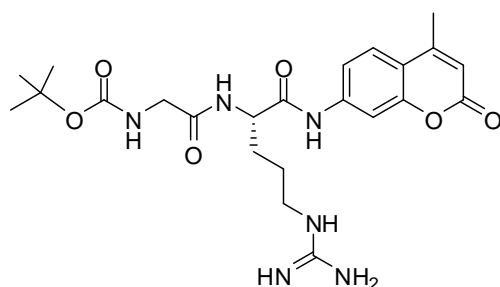
Abspaltung der Cbz-Schutzgruppen mit HBr/Eisessig

0,1 mmol der Cbz-geschützten Verbindung wurde in einem 2 mL Reaktionsgefäß in 500 µL 32% HBr in Eisessig gelöst, für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und gelegentlich geschüttelt. Das Produkt wurde durch Zugabe von 1,5 ml kaltem, Diethylether gefällt und abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde dreimal mit Diethylether gewaschen, getrocknet, mittels präparativer HPLC gereinigt und aus Wasser lyophilisiert.

6.2.6 Synthese der Vorstufen

1) Boc-Gly-Arg-AMC \times HCl

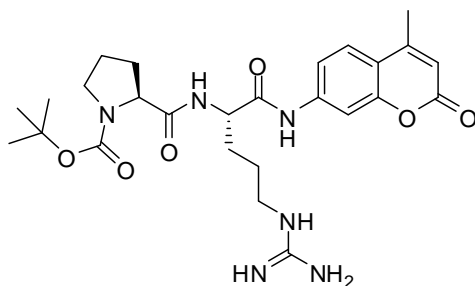
[(S)-tert-butyl 2-(5-guanidino-1-(4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-ylamino)-1-oxopentan-2-ylamino)-2-oxoethylcarbamate \times HCl]



0,2 g (0,735 mmol) Boc-Gly-OSu und 0,28 g (0,7 mmol) H-Arg-AMC \times 2 HCl wurden in 10 mL DMF suspendiert und der pH-Wert durch Zugabe von 252 μ L (1,48 mmol) DIPEA auf 8-9 eingestellt. Die Reaktion wurde für 30 min bei 0 °C und weitere 10 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 1 mL Wasser wurde für eine weitere Stunde gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das erhaltene Öl wurde nicht gereinigt und direkt weiter verwendet (siehe Intermediat **3**).
HPLC: 35,1% B (Reinheit: 98,5 %)

2) Boc-Pro-Arg-AMC \times HCl

[(S)-tert-butyl 2-((S)-5-guanidino-1-(4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-ylamino)-1-oxopentan-2-ylcarbamoyl)pyrrolidine-1-carboxylate \times HCl]



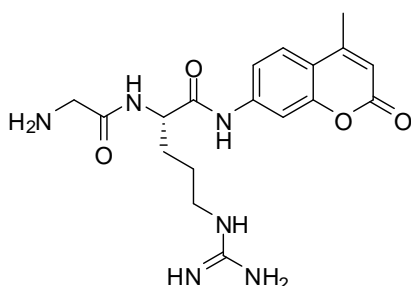
0,232 g (0,74 mmol) Boc-Pro-OSu und 0,3 g (0,74 mmol) H-Arg-AMC \times 2 HCl wurden in 10 mL DMF suspendiert und der pH-Wert durch Zugabe von 252 μ L DIPEA (1,48 mmol) auf 8-9 eingestellt. Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei 0 °C und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der pH-Wert wurde mehrfach kontrolliert und durch portionsweise Zugabe von weiteren 126 μ L (0,74 mmol) DIPEA auf pH 8-9 konstant gehalten. Es wurden 5 mL H₂O zugegeben und für drei Stunden gerührt. Die Reaktion wurde nach drei Tagen bei Raumtemperatur abgebrochen. Das Lösungsmittel wurde im

Vakuum entfernt. Das erhaltene Öl wurde nicht gereinigt und direkt weiter verwendet (siehe Intermediat **4**).

HPLC: 39,1% B (Reinheit: 42,8 %)

3) H-Gly-Arg-AMC × 2 TFA

[(S)-2-(2-aminoacetamido)-5-guanidino-N-(4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl) pentanamide × 2 TFA]



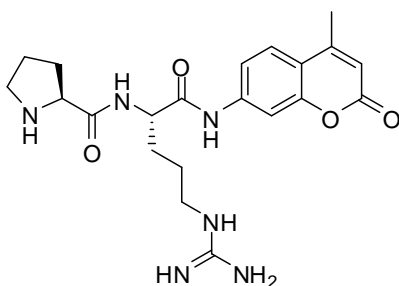
Das Intermediat **1** wurde nach *Vorschrift A* entschützt.

Ausbeute: 0,360 g (0,584 mmol, 79,5 % der Theorie über zwei Schritte),
weißer lyophilisierter Feststoff

HPLC: 23,3 % B (Reinheit: 98,0 %); MS ber. 388,42, MS gef. 389,12 [M+H]⁺

4) H-Pro-Arg-AMC × 2 TFA

[(S)-N-((S)-5-guanidino-1-(4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-ylamino)-1-oxopentan-2-yl)pyrrolidine-2-carboxamide × 2 HCl]



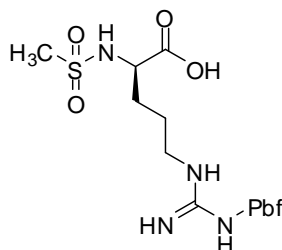
Das ölige Rohprodukt **2** wurde nach *Vorschrift A* umgesetzt.

Ausbeute: 0,376 g (0,572 mmol, 77,4 % der Theorie über zwei Schritte),
weißer lyophilisierter Feststoff

HPLC: 25,19 % B (Reinheit: 99,0 %); MS ber. 428,48, MS gef. 429,23 [M+H]⁺

5) Mes-D-Arg(Pbf)-OH

[(R)-2-(methylsulfonylamido)-5-(3-(2,2,4,6,7-pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-ylsulfonyl)guanidino)pentanoic acid]

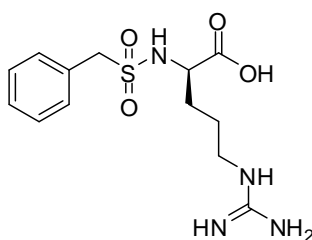


0,2 g (0,469 mmol) H-D-Arg(Pbf)-OH wurden in 6 mL Wasser/Acetonitril 1:1 suspendiert und durch Zugabe von 163 μ L (0,938 mmol) DIPEA gelöst. Anschließend wurden 145,2 μ L (1,876 mmol, 4 Äquivalente) Methylsulfonylchlorid, gelöst in 4 ml Acetonitril, tropfenweise bei 0 °C über den Zeitraum von einer Stunde zugegeben. Der pH-Wert wurde mehrfach kontrolliert und durch portionsweise Zugabe von insgesamt 326 μ L (1,876 mmol) DIPEA bei pH 8-9 konstant gehalten. Die Reaktion wurde noch weitere 2 Stunden bei 0 °C und anschließend 10 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum eingeeengt, das entstandene Öl in Ethylacetat aufgenommen, zweimal mit 5 % KHSO₄-Lösung und anschließend dreimal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt.

Ausbeute: 0,224 g (0,444 mmol, 94,7 % der Theorie), weißer lyophilisierter Feststoff
HPLC: 45,28 % B (Reinheit: 87,63 %); MS ber. 504,17, MS gef. 503,35 [M-H]⁻

6) Bzls-D-Arg-OH \times HCl

[(R)-5-guanidino-2-(phenylmethylsulfonylamido)pentanoic acid \times HCl]

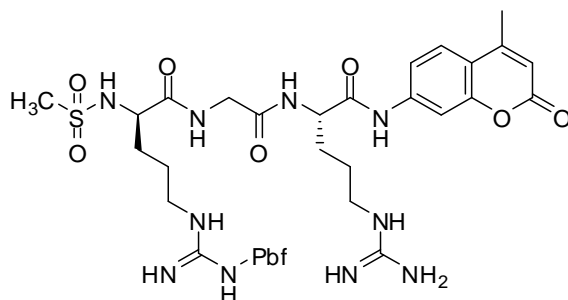


0,75 g Bzls-D-Arg(NO₂)-OH (Ref) wurden in 50 ml 90 % HAc gelöst, mit 80 mg 10 % Palladium auf Aktivkohle versetzt und zwei Tage bei Raumtemperatur mit H₂ bei Normaldruck hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das entstandene Öl wurde in 10 mL Wasser und 1 mL 32 %iger HCl gelöst, das Lösungsmittel im Vakuum wieder entfernt. Der Rückstand wurde aus Wasser lyophilisiert.

Ausbeute: 0,764 g (über 100 % der Theorie, 104,7 %), weißer lyophilisierter Feststoff
HPLC: 25 % B (Reinheit: 98,5 %); MS ber. 328,12, MS gef. 329,13 [M+H]⁺

7) Mes-D-Arg(Pbf)-Gly-Arg-AMC \times TFA

[(S)-5-guanidino-N-(4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl)-2-(2-((R)-2-(methylsulfonamido)-5-(3-(2,2,4,6,7-pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-ylsulfonyl)guanidino)pentanamido)acetamido)pentanamide × TFA]

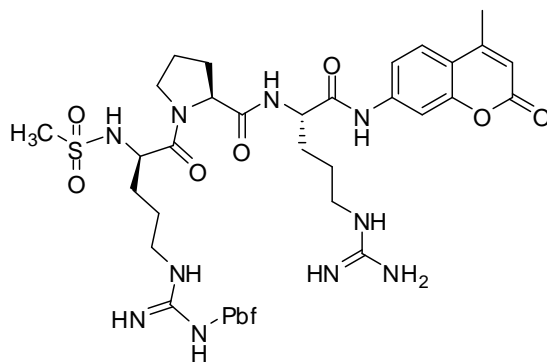


0,05 g (0,081 mmol) H-Gly-Arg-AMC (**3**) wurden mit 0,041 g (0,081 mmol) des Intermediates **5** nach *Vorschrift B* umgesetzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, das Rohprodukt ohne HPLC-Reinigung direkt für die Synthese des Substrats **MI-0508** eingesetzt.

HPLC: 44,8 % B (Reinheit: 63,9 %)

8) Mes-D-Arg(Pbf)-Pro-Arg-AMC × TFA

[(S)-N-((S)-5-guanidino-1-(4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-ylamino)-1-oxopentan-2-yl)-1-((R)-2-(methylsulfonamido)-5-(3-(2,2,4,6,7-pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-ylsulfonyl)guanidino)pentanoyl)pyrrolidine-2-carboxamide × TFA]



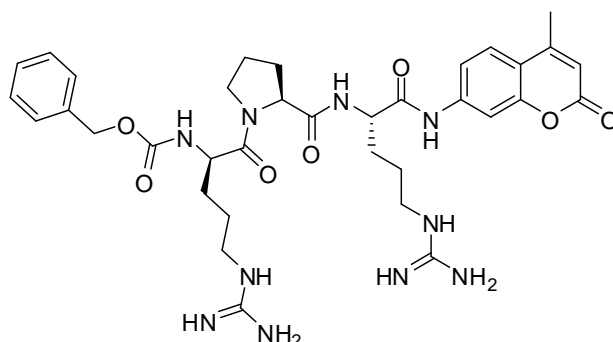
0,05 g (0,076 mmol) des Intermediates **4** wurden mit 0,038 g (0,076 mmol) des Intermediates **5** nach *Vorschrift B* umgesetzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, das Rohprodukt ohne HPLC-Reinigung direkt für die Synthese des Substrats **MI-0507** eingesetzt.

HPLC: 47,0 % B (Reinheit: 49,4 %)

6.2.7 Synthese der Substrate

MI-0501 Cbz-D-Arg-Pro-Arg-AMC × 2 TFA

[benzyl(R)-5-guanidino-1-((S)-2-((S)-5-guanidino-1-(4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-ylamino)-1-oxopentan-2-ylcarbamoyl)pyrrolidin-1-yl)-1-oxopentan-2-ylcarbamate × 2 TFA]

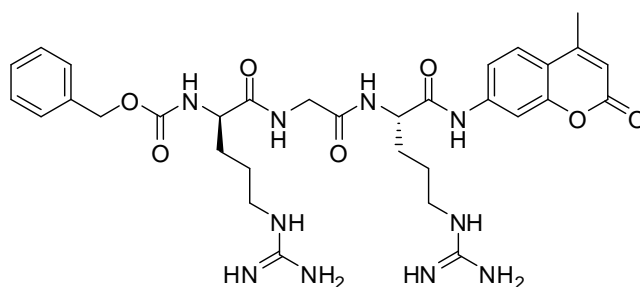


50 mg (0,076 mmol) des Intermediates **4** wurden mit 26,2 mg (0,076 mmol) Cbz-D-Arg-OH × HCl nach *Vorschrift B* umgesetzt.

Ausbeute: 72 mg (0,072 mmol, 94,5 % der Theorie), weißer lyophilisierter Feststoff
HPLC: 34,2 % B (Reinheit: 99,6 %); MS ber. 718,36, MS gef. 719,3 [M+H]⁺ und 360,24 [M+2H]⁺⁺/2

MI-0502 Cbz-D-Arg-Gly-Arg-AMC × 2 TFA

[benzyl(6S,12R)-1,17-diamino-1,17-diimino-6-(4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-ylcarbamoyl)-8,11-dioxo-2,7,10,16-tetraazaheptadecan-12-ylcarbamate × 2 TFA]

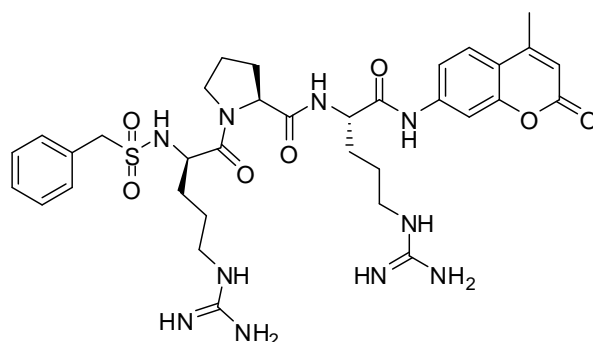


50 mg (0,081 mmol) H-Gly-Arg-AMC (**3**) und 28 mg (0,081 mmol) Cbz-D-Arg-OH × HCl wurden nach *Vorschrift B* gekoppelt.

Ausbeute: 72 mg (0,079 mmol, 98,0 % der Theorie), weißer lyophilisierter Feststoff
HPLC: 33,6 % B (Reinheit: 99,6 %); MS ber. 678,32, MS gef. 340,23 [M+2H]⁺⁺/2

MI-0503 Bzls-D-Arg-Pro-Arg-AMC × 2 TFA

[(S)-N-((S)-5-guanidino-1-(4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-ylamino)-1-oxopentan-2-yl)-1-((R)-5-guanidino-2-(phenylmethylsulfonamido)pentanoyl)pyrrolidine-2-carboxamide × 2 TFA]

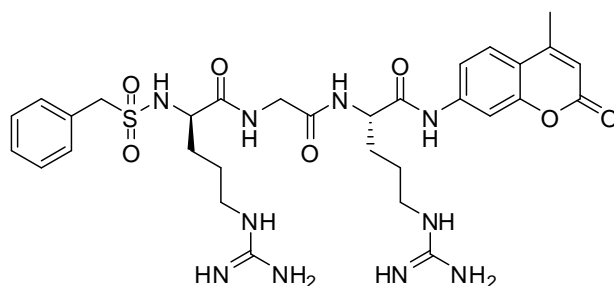


50 mg (0,124 mmol) H-Arg-AMC × 2 HCl und 66,7 mg (0,124 mmol) Bzls-D-Arg-Pro-OH × HCl (**6**) [89] wurden nach *Vorschrift B* umgesetzt.

Ausbeute: 48 mg (0,050 mmol, 40,0 % der Theorie), weißer lyophilisierter Feststoff
HPLC: 33,3 % B (Reinheit: 91,7 %); MS ber. 738,33, MS gef. 739,20 [M+H]⁺ und 370,22 [M+2H]⁺⁺/2

MI-0504 Bzls-D-Arg-Gly-Arg-AMC × 2 TFA

[(R)-5-guanidino-N-(2-((S)-5-guanidino-1-(4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-ylamino)-1-oxopentan-2-ylamino)-2-oxoethyl)-2-(phenylmethylsulfonamido)pentanamide × 2 TFA]

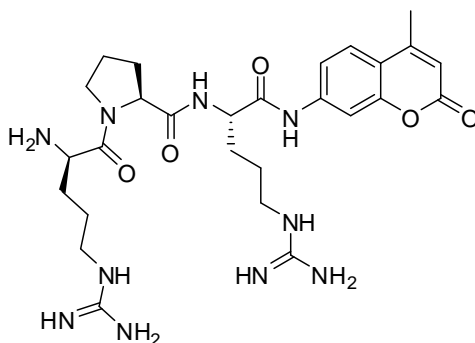


50 mg (0,081 mmol) des gereinigten Zwischenprodukts (**3**) und 29,6 mg (0,081 mmol) des Intermediates **6** wurden nach *Vorschrift B* gekoppelt.

Ausbeute: 34 mg (0,037 mmol, 45,3 % der Theorie), weißer lyophilisierter Feststoff
HPLC: 33,6 % B (Reinheit: 99,7 %); MS ber. 698,30, MS gef. 350,25 [M+2H]⁺⁺/2

MI-0505 H-D-Arg-Pro-Arg-AMC × 3 TFA

[(S)-1-((R)-2-amino-5-guanidinopentanoyl)-N-((S)-5-guanidino-1-(4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-ylamino)-1-oxopentan-2-yl)pyrrolidine-2-carboxamide × 3 TFA]

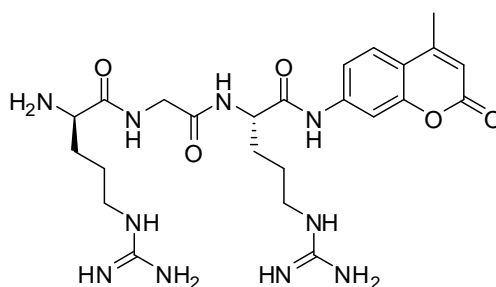


51,2 mg (0,054 mmol) des gereinigten Substrates **MI-0501** wurden nach *Vorschrift C* entschützt.

Ausbeute: 39 mg (0,042 mmol, 77,9 % der Theorie), weißer lyophilisierter Feststoff
HPLC: 25,3 % B (Reinheit: 99,9 %); MS ber. 584,32, MS gef. 293,19 [M+2H]⁺⁺/2

MI-0506 H-D-Arg-Gly-Arg-AMC × 3 TFA

[(R)-2-amino-5-guanidino-N-(2-((S)-5-guanidino-1-(4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-ylamino)-1-oxopentan-2-ylamino)-2-oxoethyl)pentanamide × 3 TFA]

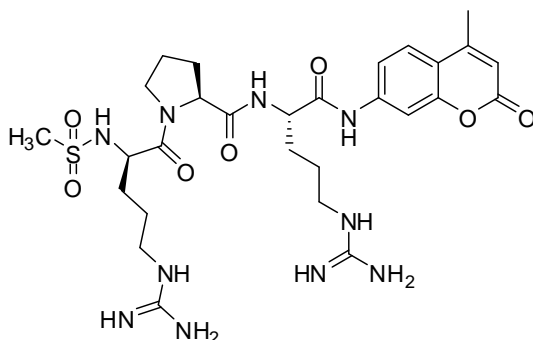


52,4 mg (0,058 mmol) des gereinigten Substrates **MI-0502** wurden nach *Vorschrift C* umgesetzt.

Ausbeute: 38 mg (0,044 mmol, 75,6 % der Theorie), weißer lyophilisierter Feststoff
HPLC: 22,4 % B (Reinheit: 100 %); MS ber. 544,29, MS gef. 273,22 [M+2H]⁺⁺/2

MI-0507 Mes-D-Arg-Pro-Arg-AMC × 2 TFA

[(S)-N-((S)-5-guanidino-1-(4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-ylamino)-1-oxopentan-2-yl)-1-((R)-5-guanidino-2-(methylsulfonamido)pentanoyl)pyrrolidine-2-carboxamide × 2 TFA]



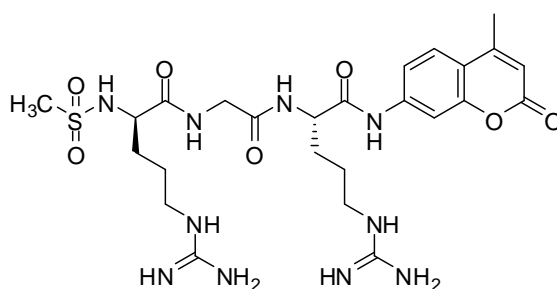
Das ungereinigte Intermediat **8** wurde nach *Vorschrift A* umgesetzt.

Ausbeute: 36 mg (0,040 mmol, 49,38 % der Theorie über zwei Schritte),
weißer lyophilisierter Feststoff

HPLC: 28,2 % B (Reinheit: 99,0 %); MS ber. 662,30, MS gef. 663,20 $[M+H]^+$ und 332,20 $[M+2H]^{++}/2$

MI-0508 Mes-D-Arg-Gly-Arg-AMC × 2 TFA

[(R)-5-guanidino-N-(2-((S)-5-guanidino-1-(4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-ylamino)-1-oxopentan-2-ylamino)-2-oxoethyl)-2-(methylsulfonamido) pentanamide × 2 TFA]



Das Rohprodukt **7** wurde nach *Vorschrift A* umgesetzt.

Ausbeute: 33 mg (0,039 mmol, 48,2 % der Theorie über zwei Schritte),
weißer lyophilisierter Feststoff

HPLC: 25,5% B (Reinheit: 97,7 %); MS ber. 622,26, MS gef. 312,17 $[M+2H]^{++}/2$

Literatur

- 1 WHO. Influenza (Seasonal). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>
- 2 WHO. Influenza virus infections in humans. http://www.who.int/influenza/GIP_InfluenzaVirusInfectionsHumans_Jul13.pdf
- 3 WHO. Epidemiological Surveillance Standards for Influenza. <http://www.who.int/influenza/resources/documents/INFSURVMANUAL.pdf>
- 4 Herold, S. (2011) Pathogenese, Klinik und Therapie der Virusgrippe. Pharmazie in unserer Zeit. **40**, 151-119
- 5 Buda, S., Schweiger, B., Buchholz, U., Köpe, K., Prahm, K. and Haas, W. (2013) Bericht zur Epidemiologie der Influenza in Deutschland Saison 2012/2013. Robert Koch Institut, Berlin
- 6 Klenk, H. D. (2011) Influenzaviren auf dem Weg vom Tier zum Menschen. Pharmazie in unserer Zeit. **40**, 104-108
- 7 Taubenberger, J. K. and Morens, D. M. (2010) Influenza: the once and future pandemic. Public Health Rep. **125 Suppl 3**, 16-26
- 8 Morens, D. M., Taubenberger, J. K. and Fauci, A. S. (2009) The persistent legacy of the 1918 influenza virus. N Engl J Med. **361**, 225-229
- 9 WHO. Pandemic (H1N1) 2009 - update 94. http://www.who.int/csr/don/2010_04_01/en/index.html
- 10 Ludwig, S., Stitz, L., Planz, O., Van, H., Fitch, W. M. and Scholtissek, C. (1995) European swine virus as a possible source for the next influenza pandemic? Virology. **212**, 555-561
- 11 Michaelis, M., Doerr, H. W. and Cinatl, J., Jr. (2009) Of chickens and men: avian influenza in humans. Curr Mol Med. **9**, 131-151
- 12 WHO. www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/en.
- 13 Osterhaus, A. D., Rimmelzwaan, G. F., Martina, B. E., Bestebroer, T. M. and Fouchier, R. A. (2000) Influenza B virus in seals. Science. **288**, 1051-1053
- 14 Zambon, M. C. (2001) The pathogenesis of influenza in humans. Rev Med Virol. **11**, 227-241

- 15 Hedestam, G. B. K., Fouchier, R. A. M., Phogat, S., Burton, D. R., Sodroski, J. and Wyatt, R. T. (2008) The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus. *Nature Reviews Microbiology*. **6**, 143-155
- 16 Michaelis, M. (2011) Influenzaviren: Biologie und Pathogenitätsfaktoren. *Pharmazie in unserer Zeit*. **40**, 110-114
- 17 Zambon, M. C. (1999) Epidemiology and pathogenesis of influenza. *J Antimicrob Chemother.* **44 Suppl B**, 3-9
- 18 Palese, P. and Shaw, M. L. (2007) Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. In: Kipe, D.M., Howley, P.M., (Ed.): *Fields Virology 5th Edition*, Lippincott Williams Wilkins, Philadelphia. *Fields Virology*, 1647-1690
- 19 Modrow, S., Falke, D., Truyen, U. and Schätzl, H. (2010) *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg
- 20 Wise, H. M., Foeglein, A., Sun, J., Dalton, R. M., Patel, S., Howard, W., Anderson, E. C., Barclay, W. S. and Digard, P. (2009) A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *J Virol.* **83**, 8021-8031
- 21 Skehel, J. J. and Wiley, D. C. (2000) Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem.* **69**, 531-569
- 22 Gamblin, S. J. and Skehel, J. J. (2010) Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. *J Biol Chem.* **285**, 28403-28409
- 23 Matrosovich, M., Stech, J. and Klenk, H. D. (2009) Influenza receptors, polymerase and host range. *Rev Sci Tech.* **28**, 203-217
- 24 Steinmetzer, T. (2011) Strategien für die Entwicklung neuartiger Grippemittel. *Pharmazie in unserer Zeit*. **40**, 160-168
- 25 Garten, W. and Klenk, H. D. (1999) Understanding influenza virus pathogenicity. *Trends Microbiol.* **7**, 99-100
- 26 Garten, W. and Klenk, H. D. (2008) Cleavage activation of the influenza virus hemagglutinin and its role in pathogenesis. In *Avian Influenza*. (Klenk, H. D., Matrosovich, M. and Stech, J., eds.). pp. 156-167, Karger, Basel
- 27 Klebe, G. and Schlitzer, M. (2011) M2-Inhibitoren und Neuraminidase-Inhibitoren. *Pharmazie in unserer Zeit*. **40**, 144-154
- 28 Gong, J., Fang, H., Li, M., Liu, Y., Yang, K. and Xu, W. (2009) Potential targets and their relevant inhibitors in anti-influenza fields. *Curr Med Chem.* **16**, 3716-3739

- 29 Samuel, C. E. (2010) Thematic minireview series: toward a structural basis for understanding influenza virus-host cell interactions. *J Biol Chem.* **285**, 28399-28401
- 30 Gabriel, G., Klingel, K., Otte, A., Thiele, S., Hudjetz, B., Arman-Kalcek, G., Sauter, M., Schmidt, T., Rother, F., Baumgarte, S., Keiner, B., Hartmann, E., Bader, M., Brownlee, G. G., Fodor, E. and Klenk, H. D. (2011) Differential use of importin- α isoforms governs cell tropism and host adaptation of influenza virus. *Nat Commun.* **2**, 156
- 31 Klenk, H. D., Garten, W. and Matrosovich, M. (2011) Molecular mechanisms of interspecies transmission and pathogenicity of influenza viruses: Lessons from the 2009 pandemic. *Bioessays*
- 32 Klenk, H. D., Rott, R., Orlich, M. and Blödorn, J. (1975) Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology.* **68**, 426-439
- 33 Böttcher, E., Matrosovich, T., Beyerle, M., Klenk, H. D., Garten, W. and Matrosovich, M. (2006) Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium. *J Virol.* **80**, 9896-9898
- 34 Chaipan, C., Kobasa, D., Bertram, S., Glowacka, I., Steffen, I., Tsegaye, T. S., Takeda, M., Bugge, T. H., Kim, S., Park, Y., Marzi, A. and Pohlmann, S. (2009) Proteolytic activation of the 1918 influenza virus hemagglutinin. *J Virol.* **83**, 3200-3211
- 35 Böttcher-Friebertshäuser, E., Freuer, C., Sielaff, F., Schmidt, S., Eickmann, M., Uhlenhorff, J., Steinmetzer, T., Klenk, H. D. and Garten, W. (2010) Cleavage of influenza virus hemagglutinin by airway proteases TMPRSS2 and HAT differs in subcellular localization and susceptibility to protease inhibitors. *J Virol.* **84**, 5605-5614
- 36 Baron, J., Tarnow, C., Mayoli-Nussle, D., Schilling, E., Meyer, D., Hammami, M., Schwalm, F., Steinmetzer, T., Guan, Y., Garten, W., Klenk, H. D. and Böttcher-Friebertshäuser, E. (2013) Matriptase, HAT, and TMPRSS2 activate the hemagglutinin of H9N2 influenza A viruses. *J Virol.* **87**, 1811-1820
- 37 Stieneke-Gröber, A., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E., Thomas, G., Roberts, C., Klenk, H. D. and Garten, W. (1992) Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO J.* **11**, 2407-2414
- 38 Okumura, Y., Takahashi, E., Yano, M., Ohuchi, M., Daidoji, T., Nakaya, T., Böttcher, E., Garten, W., Klenk, H. D. and Kido, H. (2010) Novel type II transmembrane serine proteases, MSPL and TMPRSS13, Proteolytically activate membrane fusion activity of the hemagglutinin of highly pathogenic avian influenza viruses and induce their multicycle replication. *J Virol.* **84**, 5089-5096
- 39 Pfleiderer, M. (2011) Grippe-Impfstoffe. *Pharmazie in unserer Zeit.* **40**, 126-134

- 40 Bugge, T. H., Antalis, T. M. and Wu, Q. (2009) Type II transmembrane serine proteases. *J Biol Chem.* **284**, 23177-23181
- 41 Netzel-Arnett, S., Hooper, J. D., Szabo, R., Madison, E. L., Quigley, J. P., Bugge, T. H. and Antalis, T. M. (2003) Membrane anchored serine proteases: a rapidly expanding group of cell surface proteolytic enzymes with potential roles in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **22**, 237-258
- 42 Szabo, R. and Bugge, T. H. (2008) Type II transmembrane serine proteases in development and disease. *Int J Biochem Cell Biol.* **40**, 1297-1316
- 43 Hooper, J. D., Clements, J. A., Quigley, J. P. and Antalis, T. M. (2001) Type II transmembrane serine proteases. Insights into an emerging class of cell surface proteolytic enzymes. *J Biol Chem.* **276**, 857-860
- 44 Takeuchi, T., Harris, J. L., Huang, W., Yan, K. W., Coughlin, S. R. and Craik, C. S. (2000) Cellular localization of membrane-type serine protease 1 and identification of protease-activated receptor-2 and single-chain urokinase-type plasminogen activator as substrates. *J Biol Chem.* **275**, 26333-26342
- 45 Velasco, G., Cal, S., Quesada, V., Sanchez, L. M. and Lopez-Otin, C. (2002) Matriptase-2, a membrane-bound mosaic serine proteinase predominantly expressed in human liver and showing degrading activity against extracellular matrix proteins. *J Biol Chem.* **277**, 37637-37646
- 46 Qiu, D., Owen, K., Gray, K., Bass, R. and Ellis, V. (2007) Roles and regulation of membrane-associated serine proteases. *Biochem Soc Trans.* **35**, 583-587
- 47 Afar, D. E., Vivanco, I., Hubert, R. S., Kuo, J., Chen, E., Saffran, D. C., Raitano, A. B. and Jakobovits, A. (2001) Catalytic cleavage of the androgen-regulated TMPRSS2 protease results in its secretion by prostate and prostate cancer epithelia. *Cancer Res.* **61**, 1686-1692
- 48 Guipponi, M., Vuagniaux, G., Wattenhofer, M., Shibuya, K., Vazquez, M., Dougherty, L., Scamuffa, N., Guida, E., Okui, M., Rossier, C., Hancock, M., Buchet, K., Reymond, A., Hummler, E., Marzella, P. L., Kudoh, J., Shimizu, N., Scott, H. S., Antonarakis, S. E. and Rossier, B. C. (2002) The transmembrane serine protease (TMPRSS3) mutated in deafness DFNB8/10 activates the epithelial sodium channel (ENaC) in vitro. *Hum Mol Genet.* **11**, 2829-2836
- 49 Andreasen, D., Vuagniaux, G., Fowler-Jaeger, N., Hummler, E. and Rossier, B. C. (2006) Activation of epithelial sodium channels by mouse channel activating proteases (mCAP) expressed in *Xenopus* oocytes requires catalytic activity of mCAP3 and mCAP2 but not mCAP1. *J Am Soc Nephrol.* **17**, 968-976

- 50 Stallmach, R. and Gloor, S. M. (2008) Neurobin/TMPRSS11c, a novel type II transmembrane serine protease that cleaves fibroblast growth factor-2 in vitro. *Biochem J.* **412**, 81-91
- 51 Szabo, R., Wu, Q., Dickson, R. B., Netzel-Arnett, S., Antalis, T. M. and Bugge, T. H. (2003) Type II transmembrane serine proteases. *Thromb Haemost.* **90**, 185-193
- 52 Takeuchi, T., Shuman, M. A. and Craik, C. S. (1999) Reverse biochemistry: use of macromolecular protease inhibitors to dissect complex biological processes and identify a membrane-type serine protease in epithelial cancer and normal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**, 11054-11061
- 53 Paoloni-Giacobino, A., Chen, H., Peitsch, M. C., Rossier, C. and Antonarakis, S. E. (1997) Cloning of the TMPRSS2 gene, which encodes a novel serine protease with transmembrane, LDLRA, and SRCR domains and maps to 21q22.3. *Genomics.* **44**, 309-320
- 54 Antalis, T. M., Bugge, T. H. and Wu, Q. (2011) Membrane-anchored serine proteases in health and disease. *Prog Mol Biol Transl Sci.* **99**, 1-50
- 55 Chen, Y. W., Lee, M. S., Lucht, A., Chou, F. P., Huang, W., Havighurst, T. C., Kim, K., Wang, J. K., Antalis, T. M., Johnson, M. D. and Lin, C. Y. (2010) TMPRSS2, a serine protease expressed in the prostate on the apical surface of luminal epithelial cells and released into semen in prostasomes, is misregulated in prostate cancer cells. *Am J Pathol.* **176**, 2986-2996
- 56 Kim, T. S., Heinlein, C., Hackman, R. C. and Nelson, P. S. (2006) Phenotypic analysis of mice lacking the TMPRSS2-encoded protease. *Mol Cell Biol.* **26**, 965-975
- 57 Lin, B., Ferguson, C., White, J. T., Wang, S., Vessella, R., True, L. D., Hood, L. and Nelson, P. S. (1999) Prostate-localized and androgen-regulated expression of the membrane-bound serine protease TMPRSS2. *Cancer Res.* **59**, 4180-4184
- 58 Vallet, V., Chraïbi, A., Gaeggeler, H. P., Horisberger, J. D. and Rossier, B. C. (1997) An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel. *Nature.* **389**, 607-610
- 59 Donaldson, S. H., Hirsh, A., Li, D. C., Holloway, G., Chao, J., Boucher, R. C. and Gabriel, S. E. (2002) Regulation of the epithelial sodium channel by serine proteases in human airways. *J Biol Chem.* **277**, 8338-8345
- 60 Wilson, S., Greer, B., Hooper, J., Zijlstra, A., Walker, B., Quigley, J. and Hawthorne, S. (2005) The membrane-anchored serine protease, TMPRSS2, activates PAR-2 in prostate cancer cells. *Biochem J.* **388**, 967-972
- 61 Yu, J., Mani, R. S., Cao, Q., Brenner, C. J., Cao, X., Wang, X., Wu, L., Li, J., Hu, M., Gong, Y., Cheng, H., Laxman, B., Vellaichamy, A., Shankar, S., Li, Y.,

Dhanasekaran, S. M., Morey, R., Barrette, T., Lonigro, R. J., Tomlins, S. A., Varambally, S., Qin, Z. S. and Chinnaiyan, A. M. (2010) An integrated network of androgen receptor, polycomb, and TMPRSS2-ERG gene fusions in prostate cancer progression. *Cancer Cell*. **17**, 443-454

62 Tomlins, S. A., Laxman, B., Varambally, S., Cao, X., Yu, J., Helgeson, B. E., Cao, Q., Prensner, J. R., Rubin, M. A., Shah, R. B., Mehra, R. and Chinnaiyan, A. M. (2008) Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia*. **10**, 177-188

63 Tomlins, S. A., Rhodes, D. R., Perner, S., Dhanasekaran, S. M., Mehra, R., Sun, X. W., Varambally, S., Cao, X., Tchinda, J., Kuefer, R., Lee, C., Montie, J. E., Shah, R. B., Pienta, K. J., Rubin, M. A. and Chinnaiyan, A. M. (2005) Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*. **310**, 644-648

64 Shirogane, Y., Takeda, M., Iwasaki, M., Ishiguro, N., Takeuchi, H., Nakatsu, Y., Tahara, M., Kikuta, H. and Yanagi, Y. (2008) Efficient multiplication of human metapneumovirus in Vero cells expressing the transmembrane serine protease TMPRSS2. *J Virol*. **82**, 8942-8946

65 Matsuyama, S., Nagata, N., Shirato, K., Kawase, M., Takeda, M. and Taguchi, F. (2010) Efficient activation of SARS coronavirus spike protein by the transmembrane protease, TMPRSS2. *J Virol*. **84**, 12658-12664

66 Schowalter, R. M., Smith, S. E. and Dutch, R. E. (2006) Characterization of human metapneumovirus F protein-promoted membrane fusion: critical roles for proteolytic processing and low pH. *J Virol*. **80**, 10931-10941

67 Schmidt, A. C., Schaap-Nutt, A., Bartlett, E. J., Schomacker, H., Boonyaratanakornkit, J., Karron, R. A. and Collins, P. L. (2011) Progress in the development of human parainfluenza virus vaccines. *Expert Rev Respir Med*. **5**, 515-526

68 Abe, M., Tahara, M., Sakai, K., Yamaguchi, H., Kanou, K., Shirato, K., Kawase, M., Noda, M., Kimura, H., Matsuyama, S., Fukuhara, H., Mizuta, K., Maenaka, K., Ami, Y., Esumi, M., Kato, A. and Takeda, M. (2013) TMPRSS2 is an activating protease for respiratory parainfluenza viruses. *J Virol*

69 Kawase, M., Shirato, K., van der Hoek, L., Taguchi, F. and Matsuyama, S. (2012) Simultaneous treatment of human bronchial epithelial cells with serine and cysteine protease inhibitors prevents severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *J Virol*. **86**, 6537-6545

70 Shulla, A., Heald-Sargent, T., Subramanya, G., Zhao, J., Perlman, S. and Gallagher, T. (2011) A transmembrane serine protease is linked to the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor and activates virus entry. *J Virol*. **85**, 873-882

- 71 Glowacka, I., Bertram, S., Müller, M. A., Allen, P., Soilleux, E., Pfefferle, S., Steffen, I., Tsegaye, T. S., He, Y., Gnirss, K., Niemeyer, D., Schneider, H., Drosten, C. and Pöhlmann, S. (2011) Evidence that TMPRSS2 activates the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for membrane fusion and reduces viral control by the humoral immune response. *J Virol.* **85**, 4122-4134
- 72 Laskowski, M., Jr. and Kato, I. (1980) Protein inhibitors of proteinases. *Annu Rev Biochem.* **49**, 593-626
- 73 Böttcher, E., Freuer, C., Steinmetzer, T., Klenk, H. D. and Garten, W. (2009) MDCK cells that express proteases TMPRSS2 and HAT provide a cell system to propagate influenza viruses in the absence of trypsin and to study cleavage of HA and its inhibition. *Vaccine.* **27**, 6324-6329
- 74 Mangano, D. T., Tudor, I. C., Dietzel, C., Multicenter Study of Perioperative Ischemia Research, G., Ischemia, R. and Education, F. (2006) The risk associated with aprotinin in cardiac surgery. *N Engl J Med.* **354**, 353-365
- 75 Shi, Y. E., Torri, J., Yieh, L., Wellstein, A., Lippman, M. E. and Dickson, R. B. (1993) Identification and characterization of a novel matrix-degrading protease from hormone-dependent human breast cancer cells. *Cancer Res.* **53**, 1409-1415
- 76 List, K., Bugge, T. H. and Szabo, R. (2006) Matriptase: potent proteolysis on the cell surface. *Mol Med.* **12**, 1-7
- 77 List, K., Szabo, R., Molinolo, A., Nielsen, B. S. and Bugge, T. H. (2006) Delineation of matriptase protein expression by enzymatic gene trapping suggests diverging roles in barrier function, hair formation, and squamous cell carcinogenesis. *Am J Pathol.* **168**, 1513-1525
- 78 Uhland, K. (2006) Matriptase and its putative role in cancer. *Cell Mol Life Sci.* **63**, 2968-2978
- 79 Duffy, M. J. and Duggan, C. (2004) The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumour markers for the individualised management of patients with cancer. *Clin Biochem.* **37**, 541-548
- 80 Comoglio, P. M., Giordano, S. and Trusolino, L. (2008) Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience. *Nat Rev Drug Discov.* **7**, 504-516
- 81 Colombo, E., Desilets, A., Duchene, D., Chagnon, F., Najmanovich, R., Leduc, R. and Marsault, E. (2012) Design and Synthesis of Potent, Selective Inhibitors of Matriptase. *Acs Medicinal Chemistry Letters.* **3**, 530-534
- 82 Steinmetzer, T., Dönnecke, D., Korsonewski, M., Neuwirth, C., Steinmetzer, P., Schulze, A., Saupe, S. M. and Schweinitz, A. (2009) Modification of the N-terminal

sulfonyl residue in 3-amidinophenylalanine-based matriptase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* **19**, 67-73

83 Wysocka, M., Spichalska, B., Lesner, A., Jaros, M., Brzozowski, K., Legowska, A. and Rolka, K. (2010) Substrate specificity and inhibitory study of human airway trypsin-like protease. *Bioorg Med Chem.* **18**, 5504-5509

84 Sielaff, F., Bottcher-Friebertshauser, E., Meyer, D., Saupe, S. M., Volk, I. M., Garten, W. and Steinmetzer, T. (2011) Development of substrate analogue inhibitors for the human airway trypsin-like protease HAT. *Bioorg Med Chem Lett.* **21**, 4860-4864

85 Biela, A., Sielaff, F., Terwesten, F., Heine, A., Steinmetzer, T. and Klebe, G. (2012) Ligand binding stepwise disrupts water network in thrombin: enthalpic and entropic changes reveal classical hydrophobic effect. *J Med Chem.* **55**, 6094-6110

86 Stürzebecher, A., Dönnecke, D., Schweinitz, A., Schuster, O., Steinmetzer, P., Stürzebecher, U., Kotthaus, J., Clement, B., Stürzebecher, J. and Steinmetzer, T. (2007) Highly potent and selective substrate analogue factor Xa inhibitors containing D-homophenylalanine analogues as P3 residue: part 2. *ChemMedChem.* **2**, 1043-1053

87 Schweinitz, A., Steinmetzer, T., Banke, I. J., Arlt, M. J., Stürzebecher, A., Schuster, O., Geissler, A., Giersiefen, H., Zeslowska, E., Jacob, U., Krüger, A. and Stürzebecher, J. (2004) Design of novel and selective inhibitors of urokinase-type plasminogen activator with improved pharmacokinetic properties for use as antimetastatic agents. *J Biol Chem.* **279**, 33613-33622

88 Hammami, M., Ruhmann, E., Maurer, E., Heine, A., Gutschow, M., Klebe, G. and Steinmetzer, T. (2012) New 3-amidinophenylalanine-derived inhibitors of matriptase. *MedChemComm.* **3**, 807-813

89 Sisay, M. T., Steinmetzer, T., Stirnberg, M., Maurer, E., Hammami, M., Bajorath, J. and Gütschow, M. (2010) Identification of the first low-molecular-weight inhibitors of matriptase-2. *J Med Chem.* **53**, 5523-5535

90 Steinmetzer, T., Schweinitz, A., Stürzebecher, A., Dönnecke, D., Uhland, K., Schuster, O., Steinmetzer, P., Müller, F., Friedrich, R., Than, M. E., Bode, W. and Stürzebecher, J. (2006) Secondary amides of sulfonylated 3-amidinophenylalanine. New potent and selective inhibitors of matriptase. *J Med Chem.* **49**, 4116-4126

91 Rudolph, R. and Lilie, H. (1996) In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J.* **10**, 49-56

92 Misawa, S. and Kumagai, I. (1999) Refolding of therapeutic proteins produced in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biopolymers.* **51**, 297-307

- 93 Li, M., Poliakov, A., Danielson, U. H., Su, Z. and Janson, J. C. (2003) Refolding of a recombinant full-length non-structural (NS3) protein from hepatitis C virus by chromatographic procedures. *Biotechnol Lett.* **25**, 1729-1734
- 94 Middelberg, A. P. (2002) Preparative protein refolding. *Trends Biotechnol.* **20**, 437-443
- 95 Jungbauer, A., Kaar, W. and Schlegl, R. (2004) Folding and refolding of proteins in chromatographic beds. *Curr Opin Biotechnol.* **15**, 487-494
- 96 Pedersen, J., Lauritzen, C., Madsen, M. T. and Weis Dahl, S. (1999) Removal of N-terminal polyhistidine tags from recombinant proteins using engineered aminopeptidases. *Protein Expr Purif.* **15**, 389-400
- 97 Jameson, G. W., Roberts, D. V., Adams, R. W., Kyle, W. S. and Elmore, D. T. (1973) Determination of the operational molarity of solutions of bovine alpha-chymotrypsin, trypsin, thrombin and factor Xa by spectrofluorimetric titration. *Biochem J.* **131**, 107-117
- 98 Bender, M. L., Begue-Canton, M. L., Blakeley, R. L., Brubacher, L. J., Feder, J., Gunter, C. R., Kezdy, F. J., Killheffer, J. V., Jr., Marshall, T. H., Miller, C. G., Roeske, R. W. and Stoops, J. K. (1966) The determination of the concentration of hydrolytic enzyme solutions: alpha-chymotrypsin, trypsin, papain, elastase, subtilisin, and acetylcholinesterase. *J Am Chem Soc.* **88**, 5890-5913
- 99 Knight, C. G. (1995) Active-site titration of peptidases. *Methods Enzymol.* **248**, 85-101
- 100 Saupe, S. M. and Steinmetzer, T. (2012) A new strategy for the development of highly potent and selective plasmin inhibitors. *J Med Chem.* **55**, 1171-1180
- 101 Sielaff, F. (2011) Synthese und Charakterisierung von Inhibitoren der hämagglutininspaltenden Proteasen Furin und HAT. Dissertation
- 102 Wiley, M. R., Chirgadze, N. Y., Clawson, D. K., Craft, T. J., GiffordMoore, D. S., Jones, N. D., Olkowski, J. L., Weir, L. C. and Smith, G. F. (1996) D-phe-pro-p-amidinobenzylamine: A potent and highly selective thrombin inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* **6**, 2387-2392
- 103 Gustafsson, D., Antonsson, T., Bylund, R., Eriksson, U., Gyzander, E., Nilsson, I., Elg, M., Mattsson, C., Deinum, J., Pehrsson, S., Karlsson, O., Nilsson, A. and Sorensen, H. (1998) Effects of melagatran, a new low-molecular-weight thrombin inhibitor, on thrombin and fibrinolytic enzymes. *Thromb Haemost.* **79**, 110-118
- 104 Sturzebecher, J., Prasa, D., Hauptmann, J., Vieweg, H. and Wikstrom, P. (1997) Synthesis and structure-activity relationships of potent thrombin inhibitors: piperazides of 3-amidinophenylalanine. *J Med Chem.* **40**, 3091-3099

- 105 Stürzebecher, J., Vieweg, H., Steinmetzer, T., Schweinitz, A., Stubbs, M. T., Renatus, M. and Wikström, P. (1999) 3-Amidinophenylalanine-based inhibitors of urokinase. *Bioorg Med Chem Lett.* **9**, 3147-3152
- 106 Kacprzak, M. M., Peinado, J. R., Than, M. E., Appel, J., Henrich, S., Lipkind, G., Houghten, R. A., Bode, W. and Lindberg, I. (2004) Inhibition of furin by polyarginine-containing peptides: nanomolar inhibition by nona-D-arginine. *J Biol Chem.* **279**, 36788-36794
- 107 Dixon, M. (1953) The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem J.* **55**, 170-171
- 108 Hellstern, P., Stürzebecher, U., Wuchold, B., Haubelt, H., Seyfert, U. T., Bauer, M., Vogt, A. and Stürzebecher, J. (2007) Preservation of in vitro function of platelets stored in the presence of a synthetic dual inhibitor of factor Xa and thrombin. *J Thromb Haemost.* **5**, 2119-2126
- 109 Tucker, T. J., Lumma, W. C., Mulichak, A. M., Chen, Z., Naylor-Olsen, A. M., Lewis, S. D., Lucas, R., Freidinger, R. M. and Kuo, L. C. (1997) Design of highly potent noncovalent thrombin inhibitors that utilize a novel lipophilic binding pocket in the thrombin active site. *J Med Chem.* **40**, 830-832
- 110 Schweinitz, A., Stürzebecher, A., Stürzebecher, U., Schuster, O., Stürzebecher, J. and Steinmetzer, T. (2006) New substrate analogue inhibitors of factor Xa containing 4-amidinobenzylamide as P1 residue: part 1. *Med Chem.* **2**, 349-361
- 111 Künzel, S., Schweinitz, A., Reissmann, S., Stürzebecher, J. and Steinmetzer, T. (2002) 4-amidinobenzylamine-based inhibitors of urokinase. *Bioorg Med Chem Lett.* **12**, 645-648
- 112 Shiraishi, T., Kadono, S., Haramura, M., Kodama, H., Ono, Y., Iikura, H., Esaki, T., Koga, T., Hattori, K., Watanabe, Y., Sakamoto, A., Yoshihashi, K., Kitazawa, T., Esaki, K., Ohta, M., Sato, H. and Kozono, T. (2008) Factor VIIa inhibitors: target hopping in the serine protease family using X-ray structure determination. *Bioorg Med Chem Lett.* **18**, 4533-4537
- 113 Lumma, W. C., Jr., Witherup, K. M., Tucker, T. J., Brady, S. F., Sisko, J. T., Naylor-Olsen, A. M., Lewis, S. D., Lucas, B. J. and Vacca, J. P. (1998) Design of novel, potent, noncovalent inhibitors of thrombin with nonbasic P-1 substructures: rapid structure-activity studies by solid-phase synthesis. *J Med Chem.* **41**, 1011-1013
- 114 Rittle, K. E., Barrow, J. C., Cutrona, K. J., Glass, K. L., Krueger, J. A., Kuo, L. C., Lewis, S. D., Lucas, B. J., McMasters, D. R., Morrisette, M. M., Nantermet, P. G., Newton, C. L., Sanders, W. M., Yan, Y., Vacca, J. P. and Selnick, H. G. (2003) Unexpected enhancement of thrombin inhibitor potency with o-aminoalkylbenzylamides in the P1 position. *Bioorg Med Chem Lett.* **13**, 3477-3482

- 115 Dönnecke, D., Schweinitz, A., Stürzebecher, A., Steinmetzer, P., Schuster, M., Stürzebecher, U., Nicklisch, S., Stürzebecher, J. and Steinmetzer, T. (2007) From selective substrate analogue factor Xa inhibitors to dual inhibitors of thrombin and factor Xa. Part 3. *Bioorg Med Chem Lett.* **17**, 3322-3329
- 116 Matter, H., Nazare, M., Gussregen, S., Will, D. W., Schreuder, H., Bauer, A., Urmann, M., Ritter, K., Wagner, M. and Wehner, V. (2009) Evidence for C-Cl/C-Br... π interactions as an important contribution to protein-ligand binding affinity. *Angew Chem Int Ed Engl.* **48**, 2911-2916
- 117 Katz, B. A., Sprengeler, P. A., Luong, C., Verner, E., Elrod, K., Kirtley, M., Janc, J., Spencer, J. R., Breitenbucher, J. G., Hui, H., McGee, D., Allen, D., Martelli, A. and Mackman, R. L. (2001) Engineering inhibitors highly selective for the S1 sites of Ser190 trypsin-like serine protease drug targets. *Chem Biol.* **8**, 1107-1121
- 118 Sturzebecher, J., Prasa, D., Wikstrom, P. and Vieweg, H. (1995) Structure-activity relationships of inhibitors derived from 3-amidinophenylalanine. *J Enzyme Inhib.* **9**, 87-99
- 119 Steinmetzer, T., Donnecke, D., Korsonewski, M., Neuwirth, C., Steinmetzer, P., Schulze, A., Saupe, S. M. and Schweinitz, A. (2009) Modification of the N-terminal sulfonyl residue in 3-amidinophenylalanine-based matriptase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* **19**, 67-73
- 120 Ettmayer, P., Amidon, G. L., Clement, B. and Testa, B. (2004) Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *J Med Chem.* **47**, 2393-2404
- 121 Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J., Thompson, J. D. and Higgins, D. G. (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol.* **7**, 539
- 122 Goujon, M., McWilliam, H., Li, W., Valentin, F., Squizzato, S., Paern, J. and Lopez, R. (2010) A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* **38**, W695-699
- 123 Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J. and Schwede, T. (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics.* **22**, 195-201
- 124 Kiefer, F., Arnold, K., Kunzli, M., Bordoli, L. and Schwede, T. (2009) The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Res.* **37**, D387-392
- 125 Peitsch, M. C. (1995) Protein Modeling by E-Mail. *Bio-Technology.* **13**, 658-660

- 126 Tang, J., Yu, C. L., Williams, S. R., Springman, E., Jeffery, D., Sprengeler, P. A., Estevez, A., Sampang, J., Shrader, W., Spencer, J., Young, W., McGrath, M. and Katz, B. A. (2005) Expression, crystallization, and three-dimensional structure of the catalytic domain of human plasma kallikrein. *J Biol Chem.* **280**, 41077-41089
- 127 Renatus, M., Bode, W., Huber, R., Sturzebecher, J. and Stubbs, M. T. (1998) Structural and functional analyses of benzamidine-based inhibitors in complex with trypsin: implications for the inhibition of factor Xa, tPA, and urokinase. *J Med Chem.* **41**, 5445-5456
- 128 King, J. F., Lam, J. Y. L. and Skonieczny, S. (1992) Organic Sulfur Mechanisms .35. Mechanisms of Hydrolysis and Related Nucleophilic Displacement-Reactions of Alkanesulfonyl Chlorides - Ph-Dependence and the Mechanism of Hydration of Sulfenes. *J Am Chem Soc.* **114**, 1743-1749
- 129 Frerot, E., Coste, J., Pantaloni, A., Dufour, M.-N. and Jouin, P. (1991) PyBop and PyBroP: Two reagents for the difficult coupling of the α,α -dialkyl amino acid, Aib. *Tetrahedron.* **47**, 259-270
- 130 Böttcher-Friebertshäuser, E., Stein, D. A., Klenk, H. D. and Garten, W. (2011) Inhibition of Influenza Virus Infection in Human Airway Cell Cultures by an Antisense Peptide-Conjugated Morpholino Oligomer Targeting the Hemagglutinin-Activating Protease TMPRSS2. *J Virol.* **85**, 1554-1562
- 131 Hammami, M. (2012) Development of new inhibitors for the type II transmembrane serine protease matriptase. Dissertation
- 132 Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* **230**, 1350-1354
- 133 Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1992) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology.* **24**, 145-149
- 134 Jansohn, M. R., S. (2012) Gentechnische Methoden, 5. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg
- 135 Wilson, K., Walker, j. (2010) Principles and Techniques of Biochemistry and Molekular Biology, 7th Edition. Cambridge University Press, Cambridge

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht worden:

Publikationen:

Meyer, D., Sielaff, F., Hammami, M., Bottcher-Friebertshauser, E., Garten, W. and Steinmetzer, T. (2013); Identification of the first synthetic inhibitors of the type II transmembrane serine protease TMPRSS2 suitable for inhibition of influenza virus activation. *Biochem J.* **452**, 331-343

Baron, J., Tarnow, C., Mayoli-Nussle, D., Schilling, E., Meyer, D., Hammami, M., Schwalm, F., Steinmetzer, T., Guan, Y., Garten, W., Klenk, H. D. and Bottcher-Friebertshauser, E. (2013); Matriptase, HAT, and TMPRSS2 activate the hemagglutinin of H9N2 influenza A viruses. *J Virol.* **87**, 1811-1820

Böttcher-Friebertshäuser, E., Lu, Y., Meyer, D., Sielaff, F., Steinmetzer, T., Klenk, H. D. and Garten, W. (2012); Hemagglutinin activating host cell proteases provide promising drug targets for the treatment of influenza A and B virus infections. *Vaccine.* **30**, 7374-7380

Sielaff, F., Bottcher-Friebertshauser, E., Meyer, D., Saupe, S. M., Volk, I. M., Garten, W. and Steinmetzer, T. (2011); Development of substrate analogue inhibitors for the human airway trypsin-like protease HAT. *Bioorg Med Chem Lett.* **21**, 4860-4864

Steinmetzer, T., Meyer, D., Hammami, M., Sielaff, F., Böttcher-Friebertshäuser, E., Garten W.; Verwendung von Hemmstoffen der TMPRSS2 als Arzneimittel. Patent No. DE 10 2011 108 346.8

Posterbeiträge:

“Haemagglutinin cleaving proteases – potential targets for influenza treatment“; DPhG Jahrestagung, Braunschweig; Oktober 2010

“Inhibitors of haemagglutinin cleaving proteases – Potential potential targets for influenza treatment“; Frontiers in Medical Chemistry, Münster; März 2010

Anhang

Tabelle A.1. Übersicht der verwendeten chromogenen *p*NA-Substrate.

Nr.	Substrat	Handelsname
1	H-D-Cha-Gly-Arg- <i>p</i> NA	Pefachrome TH5253
2	H-D-Hht-Gly-Arg- <i>p</i> NA	Pefachrome FXIIa
3	CH ₃ -SO ₂ -D-Chg-Gly-Arg- <i>p</i> NA	Pefachrome FIXa
4	CH ₃ -O-CO-D-Cha-Gly-Arg- <i>p</i> NA	Pefachrome FXa
5	CH ₃ -SO ₂ -D-Cha-Gly-Arg- <i>p</i> NA	Pefachrome LAL
6	CH ₃ -SO ₂ -D-Phe-Gly-Arg- <i>p</i> NA	Pefachrome tPA 5312
7	H-D-Lys(Cbz)-Pro-Arg- <i>p</i> NA	Pefachrome PCa
8	H-D-Chg-Ala-Arg- <i>p</i> NA	Pefachrome TH
9	H-D-Pro-Phe-Arg- <i>p</i> NA	Pefachrome PK 8092
10	Tos-Gly-Pro-Arg- <i>p</i> NA	Pefachrome TH 5244
11	H-D-Val-Ser-Arg- <i>p</i> NA	AK Steinmetzer
12	H-Glu-Gly-Arg- <i>p</i> NA	Bachem L-1455
13	Tos-Gly-Pro-Lys- <i>p</i> NA	Pefachrome PL5261
14	Benzoyl-β-Ala-Gly-Arg- <i>p</i> NA	Pefachrome uPA
15	H-D-Val-Cha-Arg- <i>p</i> NA	Pefachrome GK
16	Benzoyl-Pro-Phe-Arg- <i>p</i> NA	Pefachrome PK 80714

Tabelle A.2. Übersicht und analytische Charakterisierung der Inhibitoren. Die Startbedingungen für die HPLC liegen bei 10 % B.

Nr.	MI-Nr.	Retentionszeit HPLC (min)	MS kalkuliert als freie Base	MS gefunden [M+H] ⁺	Referenz
17	MI-0048	26,4	581,3	582,2	
18	MI-0109	31,3	639,3	640,2	
19	MI-0070	29,7	611,2	612,3	
20	MI-0045	33,8	601,3	602,6	
21	MI-0046	34,9	665,3	666,1	
22	MI-0047	23,5	575,3	576,1	
23	MI-0044	35,1	635,3	636,5	
24	MI-0001	16,8	556,3	557,3	[89]
25	MI-1066	32,5	571,3	572,1	[84]
26	MI-0322	18,2	528,3	529,1	[84]
27	MI-0323	20,0	570,3	571,1	[84]
28	MI-0326	17,2	562,2	563,3	[84]
29	MI-0320	36,2	561,2	562,1	[84]
30	MI-0361	18,7	589,3	590,2	[84]
31	MI-0317	34,2	547,2	548,1	[84]
32	MI-0321	36,9	662,3	663,3	[84]
33	MI-1073	33,6	585,3	586,2	[84]
34	MI-0354	26,8	499,2	500,3	[85]
35	MI-0003	36,7	553,3	554,2	[85, 89]
36	MI-0353	30,2	513,2	514,4	[85]
37	MI-0327	30,8	572,2	573,0	[84]
38	MI-0328	20,1	457,2	458,1	[85]

Nr.	MI-Nr.	Retentionszeit HPLC (min)	MS kalkuliert als freie Base	MS gefunden [M+H] ⁺	Referenz
39	MI-0329	20,9	471,2	472,3	[85]
40	MI-1067	20,1	515,2	516,4	[84]
41	MI-0371	13,1	530,2	531,4	[84]
42	MI-0360	13,2	615,3	616,3	[84]
43	MI-0367	25,2	721,3	722,4	[84]
44	MI-0381	15,7	544,3	273,3 ⁵	[84]
45	MI-0380	18,1	558,3	559,1	[84]
46	MI-0017		516,2	517,4	[89]
47	MI-0366	11,7	546,2	547,3	[84]
48	MI-0379	21,1	606,3	607,3	[84]
49	MI-0377	19,9	572,3	573,3	[84]
50	MI-0378	17,4	558,3	559,3	[84]
51	MI-0375	22,4	630,3	631,3	[84]
52	MI-0382	19,8	572,3	287,3	[84]
53	MI-0376	13,7	574,2	575,3	[84]
54	MI-1062	17,5	583,3	584,2	[84]
55	MI-1070	22,2	584,2	585,1	[84]
56	MI-1072	24,9	687,3	688,4	[84]
57	MI-1065	19,4	625,3	626,3	[84]
58	MI-1069	16,6	668,4	669,4	[84]
59	MI-1064	23,4	673,3	674,4	[84]
60	MI-1068	17,4	627,3	628,2	[84]
61	MI-1060	15,8	597,7	598,2	[84]

⁵ [M+H]⁺/2

Nr.	MI-Nr.	Retentionszeit HPLC (min)	MS kalkuliert als freie Base	MS gefunden [M+H] ⁺	Referenz
62	MI-1063	34,7	717,3	718,1	[84]
63	MI-1074	22,6	675,3	676,4	[84]
64	MI-1071	23,6	661,3	662,4	[84]
65	MI-1061	34,5	731,9	732,1	[84]
66	MI-0470	9,9	397,2	398,2	[131]
67	MI-0469	14,8	381,2	382,4	[131]
68	MI-0467	16,3	407,2	408,3	[131]
69	MI-0468	4,6	402,2	403,5	[131]
70	MI-0466	13,6	393,2	394,2	[131]
71	MI-0002	22,0	577,2	578,1	[85, 89]
72	MI-0340	36,3	534,2	535,2	[85, 89]
73	MI-0331	27,5	478,1	479,0	[85, 89]
74	MI-0332	28,1	492,2	493,0	[85, 89]
75	MI-0341	32,9	520,2	521,2	[85, 89]
76	MI-0021	8,3	543,3	544,3	[90, 115]
77	MI-0311	32,2	522,2	523,1	[101]
78	MI-0312	26,2	508,2	509,1	[101]
79	MI-0369	30,6	464,2	465,0	[101]
80	MI-0449	13,4	586,3	587,5	[88]
81	MI-0451	10,2	558,2	559,3	[88]
82	MI-0436	14,4	600,3	601,2	[88]
83	MI-0450	11,3	572,3	573,4	[88]
84	MI-0437	16,2	614,3	615,4	[88]
85	MI-0452	13,8	586,3	587,3	[88]

Nr.	MI-Nr.	Retentionszeit HPLC (min)	MS kalkuliert als freie Base	MS gefunden [M+H] ⁺	Referenz
86	MI-0444	22,8	662,3	663,4	[88]
87	MI-0454	20,9	634,3	635,6	[88]
88	MI-0445	24,1	668,3	669,5	[88]
89	MI-0453	21,7	640,3	641,3	[88]
90	MI-0446	20,8	676,3	677,4	[88]
91	MI-0455	20,6	648,3	649,7	[88]
92	MI-0432	29,4	601,6	602,2	[88]
93	MI-0406	38,7	657,2	658,1	[88]
94	MI-0439	26,1	593,3	594,4	[88]
95	MI-0438	33,9	649,3	650,4	[88]
96	MI-0441	29,7	601,2	602,1	[88]
97	MI-0440	37,9	657,2	658,4	[88]
98	MI-0414	28,7	577,7	578,2	[88]
99	MI-0448	28,2	567,2	568,3	[88]
100	MI-0447	26,8	567,2	568,1	[88]
101	MI-0413	31,2	611,2	612,3	[88]
102	MI-0412	38,0	667,3	668,4	[88]
103	MI-0443	30,8	601,2	602,1	[88]
104	MI-0442	38,7	657,2	658,4	[88]
105	MI-0434	24,6	551,2	552,2	[88]
106	MI-0405	33,0	607,3	608,2	[88]
107	MI-0433	23,8	551,2	552,3	[88]
108	MI-0403	32,0	607,3	608,2	[88]
109	MI-0431	24,2	551,2	552,3	[88]

Nr.	MI-Nr.	Retentionszeit HPLC (min)	MS kalkuliert als freie Base	MS gefunden [M+H] ⁺	Referenz
110	MI-0404	33,1	607,3	608,2	[88]
111	MI-0460	31,4	650,3	651,4	[88]
112	MI-0461	36,4	658,2	659,3	[88]
113	MI-0463	38,7	690,3	691,5	[88]
114	MI-0462	43,5	689,2	700,2	[88]
123	MI-0335	48,6	738,5	740,1	[101]

Kalibriergeraden

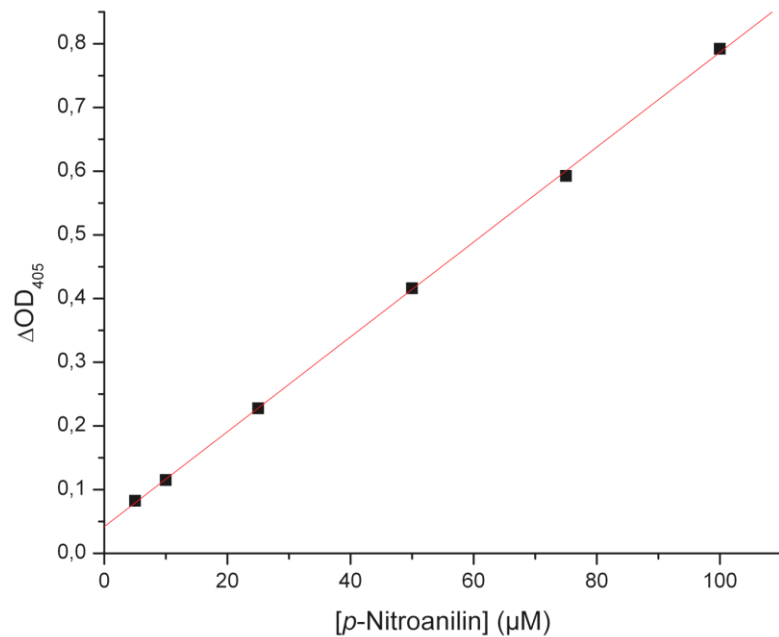


Abbildung A.1. Kalibriergerade des *p*-Nitroanilins in Standard-Puffer unter identischen Messbedingungen am IEMS-Mikroplattenleser. (Ansatzvolumen 275 μL in 96 Wellplates, Polystyren, Brand. Eine Vergleichsmessung ohne *p*-Nitroanilin unter sonst analogen Bedingungen liefert eine OD_{405} von ca. 0,05)

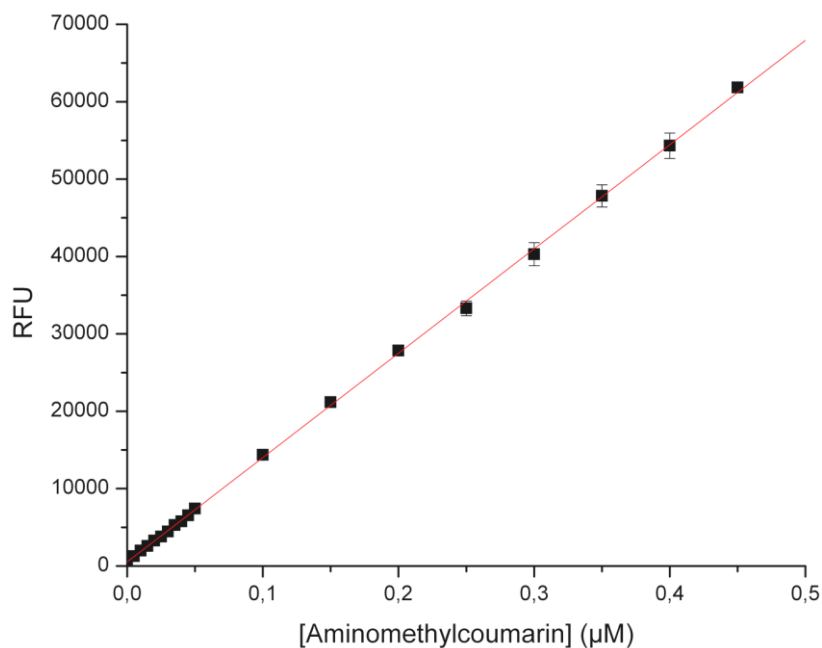


Abbildung A.2. Kalibriergerade des Aminomethylcoumarins in Standard-Puffer unter identischen Messbedingungen am Tecan-Plattenleser. (Ansatzvolumen 200 μL in 96 Wellplates, Polystyren, Nunc).

Tabelle A.3. Verwendete Enzyme für die durchgeführten molekularbiologischen Arbeiten.

Name	Konzentration	Hersteller
NdeI	10 U/ μ L	Fermentas
EcoRI	10 U/ μ L	Fermentas
T4-Ligase	5 U/ μ L	Fermentas
Phusion Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase	2 U/ μ L	BioCat

Tabelle A.4. Verwendete Pufferlösungen für die durchgeführten molekularbiologischen Arbeiten.

Name	Bestandteile	Hersteller
10xPuffer O	0,5 mM Tris-HCl pH 7,5 0,1 mM MgCl ₂ 1 M NaCl 1 g/mL BSA	Fermentas
5xHiFi	10 mM Mg ²⁺	BioCat
10xPuffer T4-Ligase	400 mM Tris-HCl pH 7,8 100 mM MgCl ₂ 100 mM DTT 5 mM ATP	Fermentas
dNTP Mix	25 mM ATP, GTP, TTP, CTP eingestellt mit NaOH auf pH 7,0	Fermentas

Tabelle A.5. Verwendete Molekulargewichtsstandards für Agarosegele und SDS-PAGE.

Name	Molekulargewichtsaufteilung	Hersteller
FastRuler DNA Ladder High Range	10000 B, 4000 B, 2000 B, 1000 B, 500 B	Fermentas
PageRulerTM Prestained	170 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 55 kDa, 40 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 15 kDa, 10 kDa	Fermentas

Tabelle A.6. Zusammensetzung des Probenpuffers für die SDS-PAGE.

Name	Bestandteile	Hersteller
6xFastRuler Loading Dye	10 mM Tris-HCl pH 7,6 0,03 % (v/v) Bromphenolblau 0,03 % (v/v) Xylencyanol FF 60 % (v/v) Glycerol 60 mM EDTA	Fermentas

TMPRSS2, PubMed: NM_005656

```

          atggct ttgaactcag ggtcaccacc agctattgga cttactatg
181 aaaaccatgg ataccaaccg gaaaaccctt atccccgaca gcccaactgtg gtccccactg
241 tctacgaggt gcatccggct cagtactacc cgtccccctg gccccagtag gccccgaggg
301 tcctgacgca ggcttccaac cccgtcgtct gcacgcagcc caaatcccca tccgggacag
361 tgtgcacctc aaagactaag aaagcactgt gcatcacctt gaccctgggg accttctctg
421 tgggagctgc gctggcgcgt ggctactctt ggaagttcat gggcagcaag tgctccaact
481 ctgggataga gtgcgactcc tcaggtagct gcatcaacct ctctaactgg tgtgatggcg
541 tgtcacactg ccccgggcgg gaggaagaga atcgggtgtg tcgcctctac ggacaaaact
601 tcatacctca ggtgtactca tctcagagga agtcctggca ccctgtgtgc caagacgact
661 ggaacgagaa ctacgggcgg gcggcctgca gggacatggg ctataagaat aatttttact
721 ctaggccaag aatagtggat gacagcggat ccaccagctt tatgaaactg aacacaagtg
781 ccggcaatgt cgatatctat aaaaaactgt accacagtga tgcctgttct tcaaaagcag
841 tggtttcttt acgctgtata gcctgggggg tcaacttgaa ctcaagccgc cagagcagga
901 ttgtgggcgg cgagagcgcg ctcccggggg cctggccctg gcaggtcagc ctgcacgtcc
961 agaacgtcca cgtgtgcgga ggctccatca tcacccccga gtggatcgtg acagccgccc
1021 actgcgtgga aaaacctctt aacaatccat ggcattggac ggcatttgcg gggattttga
1081 gacaatcttt catgttctat ggagccggat accaagtaga aaaagtgatt tctcatccaa
1141 attatgactc caagaccaag aacaatgaca ttgcgctgat gaagctgcag aagcctctga
1201 ctttcaacga cctagtgaac ccagtgtgtc tgcccaaccc aggcattgat ctgcagccag
1261 aacagctctg ctggatttcc ggtggggggg ccaccgagga gaaaggggag acctcagaag
1321 tgtgtaacgc tgccaagggtg cttctcattg agacacagag atgcaacagc agatatgtct
1381 atgacaacct gatcacacca gccatgatct gtgccggcct cctgcagggg aacgtcgatt
1441 ctggccaggg tgacagtgga gggcctctgg tcaactcgaa gaacaatatc tgggtggctga
1501 taggggatac aagctggggg tctggctgtg ccaaagctta cagaccagga gtgtacggga
1561 atgtgatggt attcacggac tggatttata gacaaatgag ggcagacggc taa

```

Abbildung A.3. Vollängen DNA der TMPRSS2.

HAT, PubMed: AB002134

```

          atgtatagg ccagcacgtg taacttcgac ttcaagattt ctgaatccat atgtagtatg
121 ttccattgtc gtcgcagggg tagtgatcct ggcagtcacc atagctctac ttgtttactt
181 tttagctttt gatcaaaaat cttactttta taggagcagt tttcaactcc taaatgttga
241 atataatagt cagttaaatt caccagctac acaggaatac aggactttga gtggaagaat
301 tgaatctctg attactaaaa cattcaaaga atcaaattta agaatcagt tcatcagagc
361 tcatgttgcc aaactgaggc aagatggtag tgggtgtgaga gcggatgttg tcatgaaatt
421 tcaattcact agaaataaca atggagcctc aatgaaaagc agaattgagt ctgttttacg
481 acaaattgctg aataactctg gaaacctgga aataaaccct tcaactgaga taacatcact
541 tactgaccag gctgcagcaa attggcttat taatgaatgt ggggccggtc cagacctaat
601 aacattgtct gagcagagaa tccttgaggg cactgaggct gaggagggaa gctggcgcgtg
661 gcaagtcagt ctgcggctca ataataccca ccactgtgga ggcagcctga tcaataacat
721 gtggatcctg acagcagctc actgcttcag aagcaactct aatcctcgtg actggattgc
781 cacgtctggt atttccacaa catttccctaa actaagaatg agagtaagaa atattttaat
841 tcataacaat tataaatctg caactcatga aaatgacatt gcacttgtga gacttgagaa
901 cagtgtcacc tttaccaaag atatccatag tgtgtgtctc ccagctgcta cccagaatat
961 tccacctggc tctactgctt atgtaacagg atggggcgct caagaatatg ctggccacac
1021 agttccagag ctaaggcaag gacaggctcag aataataagt aatgatgtat gtaatgcacc
1081 acatagttaa aatggagcca tcttgtctgg aatgctgtgt gctggagtag ctcaaggtgg
1141 agtggacgca tgtcaggggtg actctgggtg cccactagta caagaagact cacggcggct
1201 ttggttttatt gtggggatag taagctgggg agatcagtggt ggccctgccg ataagccagg
1261 agtgtatact cgagtgcagc cctaccttga ctggattagg caacaaactg ggatctag

```

Abbildung A.4. Vollängen DNA der HAT.

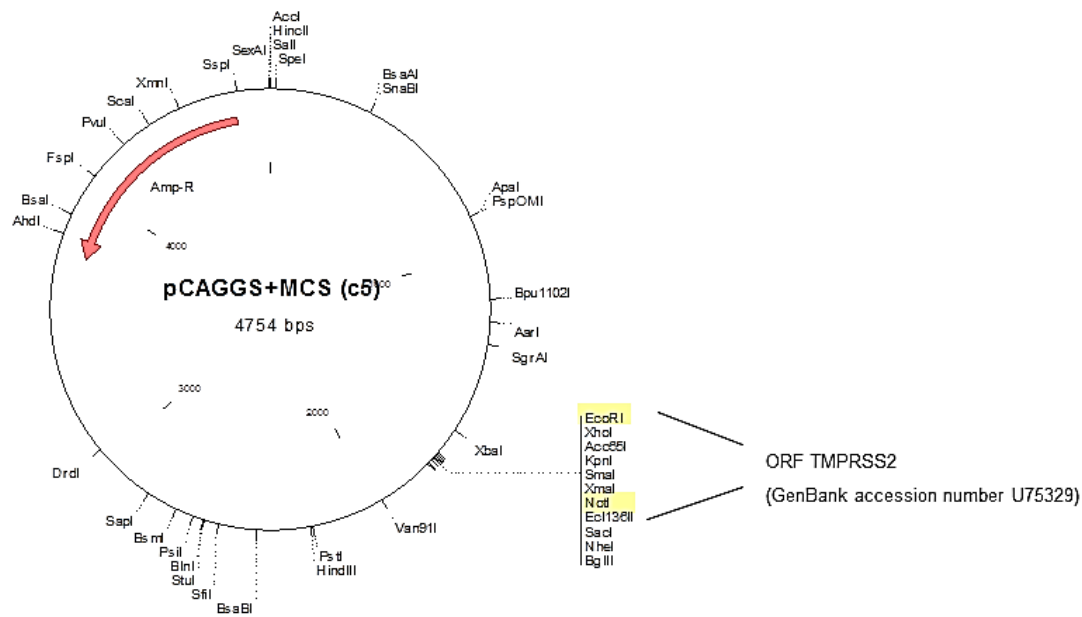


Abbildung A.5. Vektorkarte und MCS von pCAGGS. Die für die Klonierung verwendete Schnittstellen sind gelb hervorgehoben.

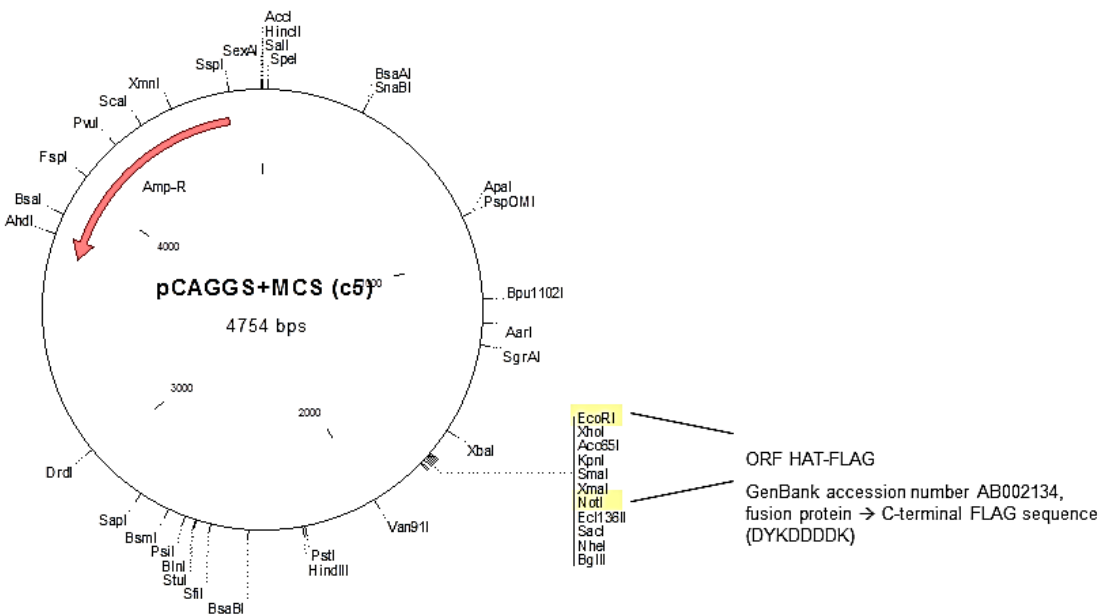


Abbildung A.6. Vektorkarte und MCS von pCAGGS. Die für die Klonierung verwendete Schnittstellen sind gelb hervorgehoben.

(a) TMPRSS2-PCR-Produkt
MetLysHisHisHisHisHisHisIleValGlyGlyGlu GlnMetLysAlaAsnGly
GGATATCATATGAAACATCACCATCACCATCACATCGTGGGCGGTGAGAG...TMPRSS2...CAAATGAAGGCAAACGGC
END
TAAGAATTCATATCC

(b) HAT-PCR-Produkt
MetLysHisHisHisHisHisHisIleLeuGlyGlyThrGlu GlnGlnThrGlyIleEND
GATATCATATGAAACATCACCATCACCATCACATCCTTGGAGGCACTGAG...HAT...GGCAACAACTGGGATCTAGGAATTCATATCC

(c) pET-24 (b)
NdeI--NheI-- BamHI-EcoRI-SacI-- SalI-- NotI-- HindIII
TATACATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTGGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGC
--- XhoI--His-Taq-----End
CGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA

(d) pET-24 (b) -TMPRSS2
MetLysHisHisHisHisHisHisIleValGlyGlyGlu GlnMetLysAlaAsnGlyEND
TATACATATGAAACATCACCATCACCATCACATCGTGGGCGGTGAGAG...TMPRSS2...CAAATGAAGGCAAACGGCTAA
HindIII
EcoRI-SacI-- SalI-- NotI---- XhoI--His-Taq-----End
GAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA

(e) pET-24 (b) -HAT
MetLysHisHisHisHisHisHisIleLeuGlyGlyThrGlu GlnGlnThrGlyIleEND
TATACATATGAAACATCACCATCACCATCACATCCTTGGAGGCACTGAG...HAT...GGCAACAACTGGGATCTAG
HindIII
EcoRI-SacI-- SalI-- NotI---- XhoI--His-Taq-----End
GAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA

Abbildung A.7. (a) PCR-Produkt der Amplifikation der TMPRSS2 aus dem Plasmid pCAGGS-TMPRSS2 mit Hilfe der Primer TMPRSS2_f NdeI und TMPRSS2_r EcoRI, die eine NdeI-Schnittstelle am 5'-Ende und eine EcoRI-Schnittstelle am 3'-Ende anfügen. Die beiden Restriktionsendonuclease-Schnittstellen sind in rot dargestellt. (b) PCR-Produkt der Amplifikation der HAT aus dem Plasmid pCAGGS-HAT mit Hilfe der Primer HAT_f NdeI und HAT_r EcoRI, die eine NdeI-Schnittstelle am 5'-Ende und eine EcoRI-Schnittstelle am 3'-Ende anfügen. Die beiden Restriktionsendonuclease-Schnittstellen sind in rot dargestellt. (c) Die MCS des Vektors pET-24(b), in die das Amplifikationsprodukt insertiert wurde. Die beiden Restriktionsendonuclease-Schnittstellen sind in rot dargestellt. (d) Konstrukt pET-24 (b)-TMPRSS2, das durch Einfügen des PCR-Produktes über NdeI- und EcoRI-Schnittstellen erhalten wurde. Die beiden Restriktionsendonuclease-Schnittstellen sind in rot dargestellt. (e) Konstrukt pET-24 (b)-HAT, das durch Einfügen des PCR-Produktes über NdeI- und EcoRI-Schnittstellen erhalten wurde. Die beiden Restriktionsendonuclease-Schnittstellen sind in rot dargestellt.

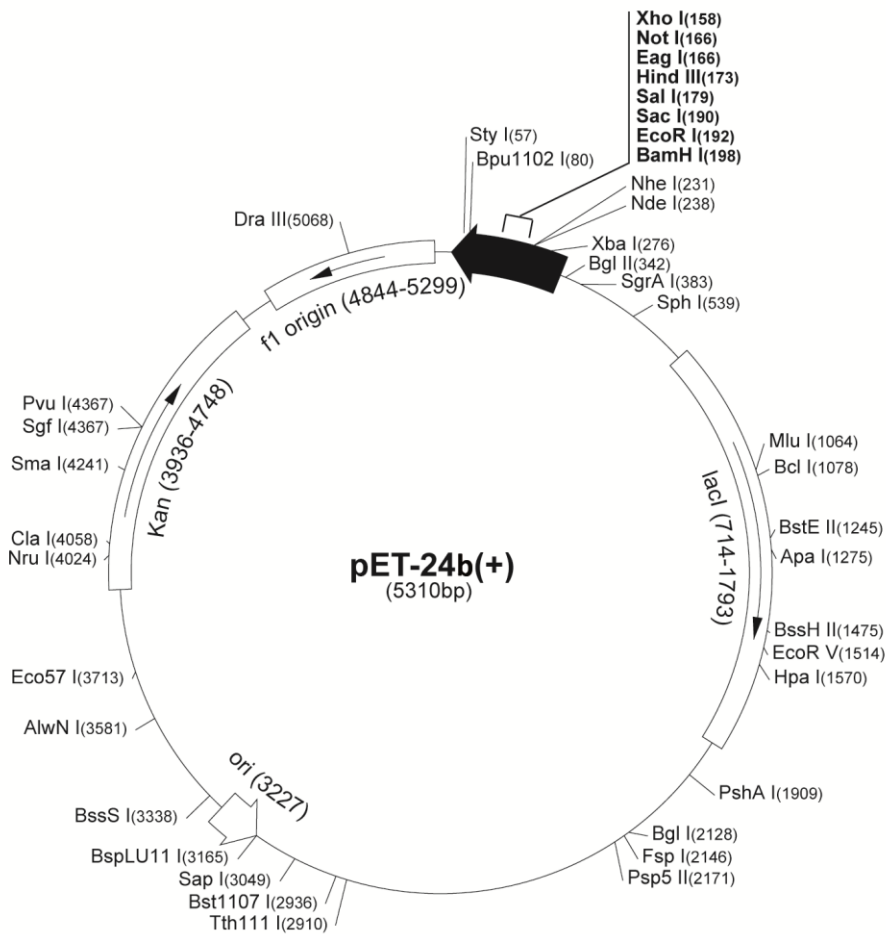


Abbildung A.8. Vektorkarte von pET-24b

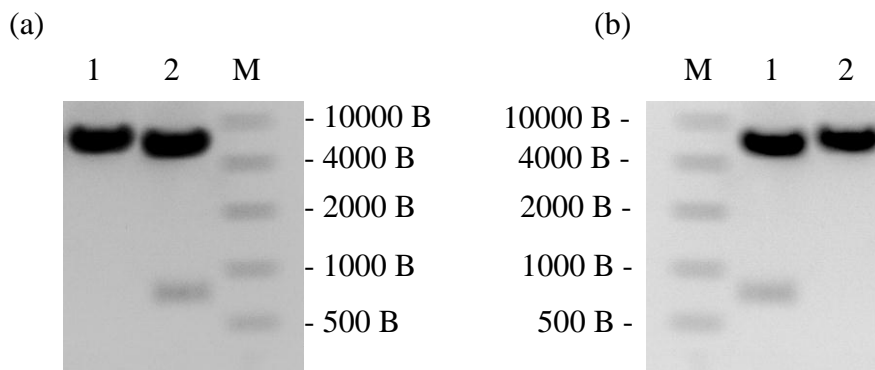


Abbildung A.9. Agarosegel-Elektrophorese. (a) Klonierung des Vektors pET-24b-TMPRSS2; Spur 1: Vektor pET-24b-TMPRSS2; Spur 2: Vektor pET-24b-TMPRSS2, der zuvor mit den Restriktionsenzymen NdeI und EcoRI inkubiert wurde; M: Marker. Das Insert der TMPRSS2 enthält ca. 750 Bp, eine Bande ist deutlich bei der entsprechenden Laufhöhe sichtbar. (b) Klonierung des Vektors pET-24b-HAT; M: Marker; Spur 1: Vektor pET-24b-HAT, der zuvor mit den Restriktionsenzymen NdeI und EcoRI inkubiert wurde; Spur 2: Vektor pET-24b-HAT. Das Insert der HAT enthält ca. 730 Bp, eine Bande ist deutlich bei der entsprechenden Laufhöhe sichtbar.

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Torsten Steinmetzer für die interessante Themenstellung und die gute Betreuung während der letzten Jahre. Ich danke ihm für die vielen fachlichen und persönlichen Gespräche und weiterhin für die Korrektur von Manuskripten und Kapiteln dieser Arbeit.

Prof. Dr. Wolfgang Garten danke ich für die hervorragende Kooperation bei der Testung der Inhibitoren in Zellkulturen und die hilfreichen Diskussionen. Weiterhin möchte ich mich sehr für Erstellung des Zweitgutachtens bedanken.

Bei Prof. Maike Petersen und Prof. Carsten Culmsee bedanke ich mich für die Bereitschaft in der Prüfungskommission mitzuwirken.

Ich danke Dr. Eva Friebertshäuser, Catharina Freuer, Joanna Baron und der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Garten herzlich für die tolle Zusammenarbeit, das Schreiben der Publikationen und die stete Bereitschaft mir immer mit Rat und Tat zur Seite zu stehen. Während der wenigen Labortage, die ich auf dem Berg verbringen durfte, wurde ich immer mit offenen Armen empfangen und sehr gut betreut.

Ich danke dem Arbeitskreis von Prof. Klebe für die nette Aufnahme im S1-Labor. Besonders bedanke ich mich bei Dr. Christian Hasewinkel für die hervorragende Zusammenarbeit im Labor, die tolle Einführung in die Arbeitstechniken, das immer offene Ohr, die gesamte Hilfe und die leider nicht ganz ausgereifte Choreographie unseres Labortanzes mit rollenden Hockern. Weiterhin danke ich Dr. Johannes Schulze Wischeler, Dr. Florian Immekus, Dr. Tina Ritschel und Dr. Cornelia Koch für die sehr nette Arbeitsatmosphäre im S1-Labor.

Bei dem „alten“ Arbeitskreis Steinmetzer, Frank, Maya, Zouhir, Sebastian, Gero, Konni, Heike und Kathleen bedanke ich mich für die immer angenehme Atmosphäre und den Zusammenhalt, das obligatorische Mittagessen, das Grillen, die Glühweinabende und die Arbeitsgruppen-Ausflüge. Ich hätte nie gedacht, dass ein Lied von Scooter mir in so guter Erinnerung bleiben würde!

Den „neuen“ Mitgliedern des Arbeitskreises Wok, Dominik, Jenni und Alex danke ich für die netten Gespräche und angenehme Stimmung im Arbeitskreis.

Bei Steffi Dörr und Christian Sohn bedanke ich mich für die Unterstützung und die netten Gespräche, die den Arbeitsalltag angenehmer machten.

Ich danke allen Assistenten des ersten Semesters für die vielen lustigen Praktikumsdienste und die gute Zusammenarbeit.

Dr. Frank Sielaff, Dr. Tobias Craan, Dres. Nan-Si und Sascha Brass, Dr. Christian Hasewinkel, Dr. Florian Immekus, Dr. Jürgen Behnen, Dr. Johannes Schulze Wischeler, Kornelia Harges, Michael Betz, Philipp Hoch, Christian Sohn, Steffi Dörr und Rainer Müller danke ich für die lustige Zeit am Institut, die alles ein wenig angenehmer machte.

Frank und Ilka, Diana und Hase, Nan-Si, Sascha, Mei-Lin und Tian, Tobi und Steffi, Joe und Marion, Evi und Philipp, Anabel, Katja, Thomas, Dörte und Mandy danke ich für die vielen und sehr schönen Aktivitäten neben der Arbeit, die Pharma-Weekends und die gesamte Unterstützung, während der letzten Jahre.

Einen besonderen Dank gebührt meinen Eltern und meiner Familie für ihre Unterstützung während des Studiums und der Promotion, ohne die dieser Abschluss nicht möglich gewesen wäre.

Von ganzem Herzen danke Jonas für seine Liebe, seine unermüdliche Unterstützung, seine Geduld und seinen Rückhalt. Danke für die zahlreiche Aufbauarbeit. Du bist mein Fels in der Brandung!

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den

